

Ana Portela Arteaga

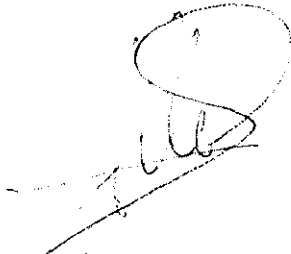
*"CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA CRONOFISIOLOGIA:
ASPECTOS EXPERIMENTALES"*

Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
1993

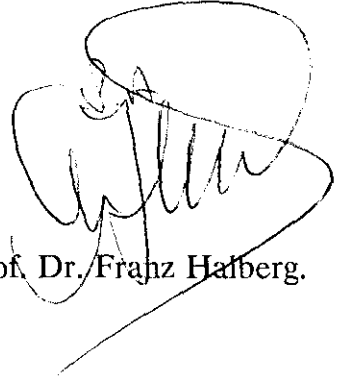
*"CONTRIBUCION AL ESTUDIO
DE LA CRONOFISIOLOGIA:
ASPECTOS EXPERIMENTALES"*

MEMORIA que para la obtención
del grado de Doctor, presenta la
Licenciada en Veterinaria Dña. Ana
Portela Arteaga.

ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCION DE:



Prof. Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal.



Prof. Dr. Franz Halberg.

Licenciada Dña. Ana Portela
Arteaga, aspirante al grado de
Doctor en Veterinaria.

Madrid, Febrero de 1993.

ESTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO EN:

**** CHRONOBIOLOGY LABORATORIES
UNIVERSITY OF MINNESOTA***

Bajo la dirección de:

PROF. FRANZ HALBERG

**** DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
FACULTAD DE VETERINARIA. UCM.***

Bajo la dirección de:

PROF. JUAN CARLOS ILLERA

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

Si citase a todas las personas que, de alguna forma, me han ayudado en la realización de este trabajo, creo que podría escribir otra Tesis. Pero desde estas páginas quiero agradecer a todos los que me prestaron su apoyo, tanto de forma moral como material. El orden que ocupan en estas páginas, no es un orden de importancia, pues todos merecerían ser citados en primer lugar.

Quiero agradecer en particular a mi director de Tesis, el Prof. Dr. Juan Carlos Illera del Portal, Profesor Titular del Departamento de Fisiología, aparte del esfuerzo y tiempo que me ha dedicado, por su estímulo, su empuje y su ubicuidad. Gracias.

Quiero manifestar mi agradecimiento al Prof. Dr. Franz Halberg, considerado como el padre de la cronobiología y Director del Laboratorio de Cronobiología de la Universidad de Minnesota, porque él fue quien me introdujo en este mundo de la cronobiología y me ha enseñado todo lo que acerca de ella sé, teniendo su puerta siempre abierta para cualquier consulta, transmitiéndome su entusiasmo y haciéndome aprovechar de un día, sus "25" horas.

Asimismo, quiero manifestar mi agradecimiento al Prof. Dr. D. Mariano Illera Martín, Catedrático-Director del Departamento de Fisiología Animal, por haberme facilitado los medios para comenzar mi andadura por este campo tan apasionante.

Deseo dar las gracias a todas las personas que me ayudaron en la realización de este estudio, en cuanto al "material" empleado en él, porque sin ellas no hubiese podido ser llevado a cabo. Aunque los estudios longitudinales en personas sanas fueron llevados a cabo en mi misma, debo agradecer a otras muchas personas que también llevaron a cabo estudios semejantes, las cuales me permitieron hacer uso de sus datos. Le estoy sinceramente agradecida a la Dra. Erna Halberg, por permitirme analizar sus largas series de datos de marcadores de crecimiento. Erna espero que algún día y gracias a la cronobiología, podamos poner solución a tu enfermedad, gracias también por tu gran hospitalidad.

Quiero darle las gracias a Germaine, Dra. Cornélissen, Directora de Cronobiometría de la Universidad de Minnesota, por guiarme en cada paso de los análisis, así como por cederme gráficos e inestimables datos, tanto de ella misma, como los del equipo internacional que con ella trabajan.

Gracias a Mary Sampson, que durante mi estancia en Minnesota me proporcionó una inestimable ayuda escribiendo a máquina y corrigiendo mi inglés.

Gracias a todos mis "compis" del Departamento de Fisiología Animal, por sus consejos, su ayuda y sus "largas cartas escritas"; gracias a Gema, Pedro, May, M^a José, Ana y Ramón. Gracias a las "M^a Josés" por su ayuda: a M^a José (secre, quien me cedió 'sin rechistar' su PC), a M^a José (Centro de Cálculo) y a M^a José (Illera).

Les doy las gracias a mis padres, porque gracias a ellos he llegado donde estoy; a mi madre por "soportarme" con tanta paciencia durante tanto tiempo y a mi padre por inculcarme sus ideas de trabajo y tesón.

A Isabel y a Queta, gracias por todos esos largos fines de semana (y madrugadas) dedicados a las tablas y a la bibliografía, y a Pelu y José Manuel por la ayuda que me han prestado.

A Alberto, gracias por ser tan positivo en todos los momentos y por darme todo su apoyo, moral y material.

En fin, gracias a todos los que cuando estuve lejos hicieron que me sintiese cerca.

CONTENIDO

CONTENIDO

OBJETIVO	2 - 3
INTRODUCCION	4 - 59
VARIACIONES CIRCADIANAS DEL CORTISOL	
MARCADORES DE CRECIMIENTO, CA125 y CA130	
PRESION SANGUINEA Y FRECUENCIA CARDIACA	
DISEÑO EXPERIMENTAL	
ANALISIS DE DATOS EN CRONOBIOLOGIA	
MATERIAL Y METODOS	60 - 75
OBTENCION Y ANALISIS DE LAS MUESTRAS	61 - 70
Experimento 1: Variación circadiana del cortisol	
Experimento 2: Marcadores de crecimiento, CA125 y CA130	
Experimento 3: Alofase circatrigintana entre presión sanguínea y frecuencia cardiaca	
METODOLOGIA ANALITICA CRONOBIOLOGICA	70 - 75
Experimento 1: Variación circadiana del cortisol	
Experimento 2: Marcadores de crecimiento, CA125 y CA130	
Experimento 3: Alofase circatrigintana entre presión sanguínea y frecuencia cardiaca	
RESULTADOS	76 -126
Experimento 1: Variación circadiana del cortisol	
Experimento 2: Marcadores de crecimiento, CA125 y CA130	
Experimento 3: Alofase circatrigintana entre presión sanguínea y frecuencia cardiaca	

DISCUSION	127 -145
Experimento 1: Variación circadiana del cortisol	
Experimento 2: Marcadores de crecimiento, CA125 y CA130	
Experimento 3: Alofase circatrigintana entre presión sanguínea y frecuencia cardiaca	
CONCLUSION	146 -147
GLOSARIO	148 -161
BIBLIOGRAFIA	162 -189

ABREVIATURAS

α	Nivel de Probabilidad
τ	Periodo
ϕ	Acrofase
\equiv	Equivale
a	Años
A	Amplitud
a.m.	Ante meridiano
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADH	Hormona antidiurética
ANOVA	Análisis de Varianza
AP	Ana Portela
°C	Grados Centígrados
CA125	Cancer Antigen 125
CA130	Cancer Antigen 130
cm	Centímetros
CRH	Factor liberador de corticotropina
CV	Coefficiente de Variación
d	Días
DL	Dosis Letal
EH	Erna Halberg
ELISA	Enzimo inmunoanálisis
ES	Error Standard
f	Frecuencia
F	F de Snédécor
FC	Frecuencia Cardiaca
g	Gramos
G	Gauge
GC	Germaine Cornélissen
h	Horas
H ₀	Hipótesis nula

RIA	Radioinmunoanálisis
RSS	Suma residual de los cuadrados
SD	Serialmente Dependiente
SI	Serialmente Independiente
t	t de student
U	Unidades
UCM	Universidad Complutense de Madrid
VR	Proporción de Variabilidad
W	Forma de la curva

OBJETIVO

Como es muy común hoy en día y desde hace muchos años, los animales se utilizan en experimentación, casi siempre con la idea de poder aplicar, posteriormente, a los seres humanos las "ventajas" y soluciones que en ellos encontramos. Pero antes de poder emplear estos resultados obtenidos de la experiencia animal en las personas deberíamos tener un conocimiento más exacto de la fisiología de los mismos, por esto creímos conveniente ahondar en el campo de la **cronofisiología** y tener en cuenta la influencia del tiempo en todas las variables biológicas que hoy en día se investigan. También nos pareció oportuno profundizar más en el campo de los diseños de los estudios experimentales que llevamos a cabo en los animales, para poder evitar la gran variabilidad que existe en los parámetros y a la que hace referencia la bibliografía actual, dando unos márgenes fisiológicos muy amplios; por ejemplo, los niveles de referencia de cualquier hormona, no sólo una variabilidad interespecífica sino intraespecífica.

Estudiamos la existencia de lo(s) ritmo(s) del cortisol plasmático y comprobamos la variación de sus concentraciones en el tiempo, dando unos perfiles más precisos que los encontrados hasta ahora.

Asimismo, quisimos comprobar las diferencias o similitudes existentes entre los ritmos del cortisol de distintos conejos (NZW) alojados en diferentes ciclos de luz-oscuridad y si existía alguna diferencia en las concentraciones de cortisol al obtener las muestras de forma serialmente dependiente o independiente.

Por otro lado, como uno de los objetivos primordiales, en biomedicina, es la lucha contra las enfermedades actuales como son el cáncer, el SIDA, enfermedades cardiovasculares (infartos de miocardio o hipertensión) frente a las cuales hoy en día no existen verdaderas soluciones, debemos poner todos los medios a nuestro alcance para encontrarlas y, sobre todo, prevenirlas. Este es uno de los objetivos principales de la **cronobiología**: la prevención de muchas de las enfermedades denominadas en la actualidad como "incurables" y si esto no es posible, al menos lograr una temprana detección de las mismas mediante un control rutinario, como es el seguimiento de los parámetros de los ritmos (MESOR, amplitud y acrofase)

Por las razones anteriormente expuestas, hemos estudiado los ritmos de los incorrectamente llamados "marcadores tumorales" (marcadores de crecimiento) CA125 y CA130, empleados en el seguimiento de la evolución de tumores ginecológicos, para prevenir la aparición de estos tumores, o una vez detectados llevar a cabo una correcta cronoterapia.

Asimismo se estudiaron la frecuencia cardíaca y la presión arterial intentando conocer sus ritmos como el circadiano, circacentuminutano, circasemidiano, circatrigintano, etc, y de esta forma, al detectar cualquier alteración en los parámetros de los mismos, poder prevenir enfermedades cardiovasculares.

INTRODUCCION

La cronobiología es la ciencia que se ocupa de cuantificar e investigar, objetivamente, los mecanismos de la estructura temporal biológica, el **cronoma**, que incluye las manifestaciones rítmicas de la vida. Fue diseñada para describir las características de los ritmos, como son el **MESOR** (M), la **amplitud** (A), la **acrofase** (ϕ), el **periodo** (τ), la **frecuencia** (f) o la **forma de la curva** (W).

El término cronobiología, introducido por Halberg (1957), es un neologismo que procede de los vocablos *chronos* (=tiempo), *bio* (=vida) y *logie* (=ciencia). En términos fisiológicos, proporciona conceptos de aplicación general y técnicas para resolver (observar y cuantificar) problemas referentes al estudio de los ciclos predecibles en el organismo, así como para aislar los efectos ambientales, de los mecanismos endógenos propios que están enmascarados. La cronobiología incluye, entre otras, las siguientes disciplinas: cronofisiología, cronopatología y cronofarmacología, la cual a su vez, comprende cronotoxicología y cronoterapia (por citar algunas).

La cronofisiología, disciplina en la cual estamos más interesados, se encarga del estudio de las manifestaciones temporales de los procesos fisiológicos, evaluando asimismo, las interacciones cíclicas biológicas (endocrinas, nerviosas, metabólicas, etc.) con el organismo, el cual sirve de base a las características biológicas temporales y a sus interacciones con el medio ambiente. Tanto la cronofisiología, como cualquiera de las disciplinas citadas anteriormente, necesitan de una serie de métodos para poder ser resueltas; la metodología empleada o ritmometría va a permitir describir un ritmo, mediante la estimación de sus características anteriormente mencionadas: MESOR, amplitud, acrofase y/o periodo, las cuales se calculan mediante hipótesis deducidas estadísticamente.

La vida, ya sea determinada por bioquímicos, fisiólogos o morfólogos, envuelve cambios en el tiempo; cualquier determinación de una variable fisiológica en particular, debería ser especificada de acuerdo con el momento en que es estudiada. En biología, en general, las diferencias que encontramos, por ejemplo, en función del momento del día o del año, pueden ser enormes. Normalmente podemos encontrar

valores máximos y mínimos que se repiten periódicamente; también nos encontramos con manifestaciones consecutivas de acontecimientos similares que ocurren en intervalos regulares, formando ciclos manifiestos o bioperiodicidades.

El tiempo biológico no es sólo un componente importante de la vida animal y vegetal, sino que también se puede determinar cuando los ciclos están ocultos. Tan pronto como se han podido medir las diferentes variables en función del tiempo, y de forma repetida, nos encontramos con las variaciones periódicas, las cuales mediante métodos especiales de cronobiometría pueden ser resueltas y cuantificadas en los seres humanos, en células individualizadas procedentes de mamíferos, en organismos unicelulares e incluso en procariotas.

Los cambios relacionados con el tiempo determinan la vida como un espectro de bioperiodicidades. Cambios similares de aproximadamente (*circa*), pero no exactamente el mismo tipo y extensión, recurren en aproximadamente (no exactamente) los mismos intervalos, en aproximadamente las mismas secuencias, y a todos los niveles de organización de la vida animal o vegetal, desde procariotas a seres humanos (Halberg, 1969).

Las periodicidades, no siempre son ciclos precisos, son más generales que la vida, y se encuentran en muchos de los fenómenos investigados por diferentes disciplinas, desde la astronomía hasta la física cuántica. Las partículas elementales pueden ser vistas como ondas (Hawking, 1988), las reacciones químicas pueden ser periódicas, como lo son la fisiología y el comportamiento de los microorganismos, incluyendo tanto a las bacterias como a los organismos unicelulares (Giese, 1979; Halberg y Connell, 1961); se puede decir lo mismo de las células *ex vivo*: p.e., las células adrenales del ratón sintetizan corticosterona *in vitro* no de una forma arbitraria, sino que cada célula lo hace con una periodicidad similar (Halberg, 1963). Las células pineales perfundidas también muestran bioperiodicidades (Ungar y Halberg, 1963; Leung *et al.*, 1990), de igual forma que hacen los organismos multicelulares y tal como los animales exhiben comportamientos bioperiódicos en sus actividades motoras y de alimentación, durante el crecimiento o el desarrollo y la

pubertad.

Los individuos exhiben ritmos **espontáneos** o ritmos "a". Los ritmos **reactivos** o "b" caracterizan la respuesta ante un estímulo, ya sea físico como ruido o radiación, químico como etanol o bacteriológico como endotoxinas (Halberg *et al.*, 1955; Haus y Halberg, 1959; Halberg *et al.*, 1960). La respuesta a diferentes fármacos es bioperiódica, al igual que la dosis de un fármaco o las radiaciones que matan el 50% de los animales en 30 días, la DL^{30}_{50} (todos estos hallazgos conducen hacia una cronotoxicología y cronofarmacología). Una modulación pineal del efecto hipofisario sobre la producción de adrenocorticotesterona es un caso puntual (Sánchez de la Peña *et al.*, 1983). Los ritmos "d" son intermodulaciones entre 3 ó más entidades, en más de una frecuencia. Cuando estos ritmos se demuestran *in vivo* se designan por letras griegas: los espontáneos son α , los reactivos son β , las intermodulaciones en una frecuencia son γ y a dos o más frecuencias son δ .

El margen de frecuencias encontrado en la naturaleza es enorme, va desde fenómenos electromagnéticos a biológicos; en estos últimos este margen se extiende desde milésimas de segundo, como las ondas cerebrales o los 1000 Hz de descarga de los peces eléctricos, hasta más de cientos de años, como el ciclo de floración de 120 años del bambú chino (como caso excepcional). En el espectro general de las frecuencias, las biológicas ocupan, relativamente, una banda estrecha. Algunas frecuencias están normalmente expresadas como sus recíprocas ($1/f = \tau$), es decir como periodos, aún así el nombre de los dominios del espectro de bioperiodicidades derivan de la frecuencia. Esta elección de la frecuencia, en vez del periodo, está hecha para situar los cambios biológicos en relación con el espectro de las frecuencias de las radiaciones electromagnéticas.

Las bioperiodicidades con un ciclo aproximado de 24 horas, con unos límites aproximados entre 20 y 28 horas se describen como **circadianas** y frecuencias mayores o menores que las circadianas son denominadas como **ultradianas** e **infradianas**, respectivamente. A continuación vamos a citar algunos de estos ritmos biológicos, con sus ejemplos ilustrativos respectivos:

REGION DEL DOMINIO	MARGEN	EJEMPLO
Ultradiano	$\tau < 20 \text{ h}$	
circaoctohorano	$\tau = 8 \pm 1 \text{ h}$	Presión sanguínea y FC
circasemidiano	$\tau = 12 \pm 2 \text{ h}$	Frecuencia cardíaca y FC
Circadiano	$\tau = 24 \pm 4 \text{ h}$	PS, FC, Temperatura
diano	$\tau = 24 \pm 0,2 \text{ h}$	FC sincronizada
Infradiano	$\tau > 28 \text{ h}$	
circasemiseptano	$\tau = 3,5 \pm 1 \text{ d}$	Muerte repentina en humana
circaseptano	$\tau = 7 \pm 1 \text{ d}$	Rechazo trasplantes corazón
circadiseptano	$\tau = 14 \pm 3 \text{ d}$	Excrec. urin. 17-oxoester.
circavigintano	$\tau = 21 \pm 3 \text{ d}$	Ciclo sexual vaca
circatrigintano	$\tau = 30 \pm 5 \text{ d}$	Presión sanguínea
circanual	$\tau = 1 \pm 2 \text{ m}$	PRL y cortisol
circasepteniano	$\tau = 7 \pm 1 \text{ a}$	Indice gonadal invert. mar.
circaduodeceniano	$\tau = 12 \pm 2 \text{ a}$	Presión sanguínea

Las bioperiodicidades de los potenciales de acción del cerebro y del corazón registradas en un electroencefalograma o electrocardiograma, respectivamente, son ultradianas (Frank *et al.*, 1961; Crowley *et al.*, 1972). Las circadianas son las más estudiadas; por ejemplo, se demostró un cambio circadiano en el recuento de los eosinófilos sanguíneos en diferentes especies: peces, ratones, ratas, hamster, perros, monos y humanos (Halberg, 1950; Halberg *et al.*, 1951; Flink y Halberg, 1952; Halberg y Nabias, 1954; Chaudry y Halberg, 1960). Entre los infradianos se puede observar una bioperiodicidad de aproximadamente una semana o circaseptana, en los rechazos de trasplantes de órganos.

Bioperiodicidades de aproximadamente un mes, no sólo se encuentran en las

mujeres, sino también en los hombres y en las mujeres antes de la pubertad, cuando existe ausencia de menstruación, durante el embarazo y en la menopausia, así como en presencia del ciclo menstrual. Aproximadamente anuales o variaciones circanuales son comunes en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en el peso del ovario del pez gato *Jamuna river* de la India, el cual varía desde aproximadamente 16 g cuando sopla el monzón, hasta aproximadamente 1 g, 6 meses más tarde. Cuando estos peces se encuentran alojados en continua oscuridad durante años, el peso del ovario continúa siendo cíclico con un ciclo de curso libre, de aproximadamente 1 año (Sundararaj *et al.*, 1973, 1982). Un circasepteniano o ritmos de 7 años, aproximadamente, se encuentran en el índice gonadal de algunos invertebrados marinos (Lamba *et al.*, 1981).

Cuando los ritmos, en el estricto sentido de la palabra, son definidos como fenómenos confirmados mediante deducción y formulables algorítmicamente, cada organismo presenta su propio **cronoma**, incluyendo los ritmos de multifrecuencia que siguen las tendencias del crecimiento, desarrollo y envejecimiento. Los ritmos son endógenos, en parte, están programados en el código genético del organismo, la información pertinente está localizada en el gen *per*, llamado de esta forma por periodo. Este gen codifica para sintetizar proteínas en la célula que coordinará los ritmos. Estos hallazgos han sido realizados en las moscas de la fruta (Hamblen-Coyle *et al.*, 1986, 1992; Hardin *et al.*, 1990; Young, 1992) y en las levaduras, documentados desde hace tiempo en las mismas especies y en muchas otras, mediante el fenómeno de curso libre (Halberg, 1970).

La endogenicidad ha sido demostrada en bastantes experimentos diferentes y en bastantes variables, p.e., estudiando la temperatura en ratones ciegos (Haus *et al.*, 1967). En estos ratones las variaciones de los eosinófilos sanguíneos circulantes no muestran un ritmo sincronizado de 24 horas (con valores altos durante el periodo de luz, cuando están alojados en un régimen de luz que alterna 12 horas de luz con 12 de oscuridad). En lugar de este ritmo de 24 horas, en las células eosinófilas sanguíneas aparece un ritmo de 23,5 horas en un ciclo ambiental de 24 horas de luz y oscuridad. Este estudio se llevó a cabo en paralelo con otro grupo de ratones con

visión normal en los cuales se encontró un ritmo de 24 horas. Los análisis realizados a mediodía y a medianoche en los grupos de ratones ciegos al principio eran muy confusos; para empezar, los ratones con visión normal tenían un pico en mitad del intervalo de luz y una depresión en mitad del intervalo de oscuridad, y la diferencia era estadísticamente significativa. Los ratones ciegos, a su vez, tenían diferencias que cambiaban sistemáticamente desde un pico en mitad del intervalo de luz a un pico en mitad del intervalo de oscuridad. Se decidió entonces estudiar una variable que pudiese ser medida varias veces al día, en los mismos animales sin una carga excesiva para ellos (Bruss *et al.*, 1958; Halberg, 1954).

En vez de emplear el muestreo sanguíneo, el cual no podía ser llevado a cabo fácilmente pues consistía en tomar muestras cada 4 horas durante varios meses, se decidió estudiar el ritmo de la temperatura corporal. Este ritmo, en animales con visión normal mantenidos con luz desde las 06:00 hasta las 18:00 horas, muestra unos picos constantes durante las horas de oscuridad y depresiones durante las horas de luz. Los picos ocurren, cada día, aproximadamente hacia las mismas horas, sobre las 20:30 horas. En contraste, los animales ciegos muestran picos que ocurren más temprano, cada día, hasta que al final, tras varias semanas, el pico se produce a las 08:30 en vez de a las 20:30 horas. Entonces un fenómeno no deseado, llamado "resultados controversos", fue resuelto rápidamente mediante la expresión de una presumible estructura temporal endógena.

Volviendo a los seres humanos, todo lo aprendido de las otras formas de vida se puede extrapolar a estos. Personas voluntarias, las cuales vivieron en simas, aisladas de los efectos ambientales cíclicos de 24 horas, lejos de la influencia de los ciclos de la noche y el día, y de otras influencias psico-químicas y sociales, desarrollaron una rutina diaria cercana a 24 horas, pero ligeramente más larga; acostándose cada día un poco más tarde, mostrando en su temperatura corporal y en otras variables, periodos ligeramente más largos de 24 horas (Siffre *et al.*, 1966; Apfelbaum *et al.*, 1969).

En los seres humanos, una evidencia crítica en cuanto a la elaboración interna

de los ritmos (endogenicidad de los ritmos) está ligada a la, mal entendida, relación entre la presión sanguínea y los efectos de la actividad motora, así como las respuestas psicofisiológicas, no sólo para presión sanguínea sino también para la frecuencia cardíaca. Estudios de estas dos variables realizados en personas gemelas, demuestran rigurosamente la heredabilidad de la componente genética de la amplitud circadiana para la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca al obtener un coeficiente de correlación, entre clases, altamente significativo (estadísticamente) (Halberg, 1983; Hanson *et al.*, 1984; Kumagai *et al.*, 1992).

Un ciclo externo, como es el ciclo luz-oscuridad, alternando cada 12 horas, únicamente puede sincronizar un ritmo circadiano, cuando el periodo del ciclo externo es cercano al periodo endógeno natural. Los ratones pueden tener un ritmo sincronizado de 22 horas si están sincronizados por un régimen de 11:11 horas (luz-oscuridad, LO). La luz en este caso actúa como **sincronizador**, también llamado **zeitbeger**. El término alemán *zeitbeger*, significa "dador de tiempo", no obstante sólo puede ser interpretado como un donante del tiempo de reloj o de calendario, no del tiempo interno (Halberg *et al.*, 1954; Nelson *et al.*, 1975; Aschoff y Pohl, 1978).

Pero el tiempo fisiológico continúa siendo cíclico, en ausencia de estos dadores de tiempo, con una frecuencia ligeramente diferente a la de los ciclos ambientales que la pueden sincronizar, como queda documentado en el curso libre de los ratones. No sólo los ritmos circadianos, de la temperatura corporal, los eosinófilos, la corticosterona sérica, sino otros ritmos en la sangre y los órganos, y dentro de la célula, están todos sincronizados por el ciclo de 24 horas de alternancia de luz y oscuridad, como sincronizador. Pero si el régimen de luz utilizado consiste, por ejemplo, en 6 horas de luz alternando con 6 horas de oscuridad, es decir, un ciclo de 12 horas luz-oscuridad, bastante diferente del ciclo interno fisiológico, de aproximadamente 23,5 horas en los ratones investigados, el régimen cíclico de luz-oscuridad no sincronizará estos ritmos y los ratones estarán en **curso libre**, como los ratones ciegos citados anteriormente (Halberg *et al.*, 1954; Halberg, 1959). Estas son otras líneas indirectas de evidencia que apoyan la endogenicidad de los ciclos. Incluso bajo drásticas condiciones existe un programa interno que prepara a los mamíferos

para las actividades diarias (Halberg, 1953). Los ritmos hormonales endógenos muestran un aumento en sus concentraciones, antes incluso de despertarse, y la eosinopenia endógena ocurre en preparación a las actividades diarias, por la mañana antes de levantarse para las personas y los perros (Halberg y Nabias, 1955; Kaine *et al.*, 1955), y por la tarde para los de actividad nocturna como ratones, ratas y hamsters (Halberg, 1951; Halberg y Nabias, 1954; Halberg y Chaundry, 1960). Este aumento, como un aspecto del tiempo interno, persiste en ausencia de cualquier ciclo ambiental conocido. En otras palabras, los ritmos circadianos están sincronizados por factores externos (tiempo externo) como es la luz o la alarma de un reloj, pero no están determinados o producidos por los ciclos ambientales.

Los experimentos en los ratones ciegos, citados con anterioridad, fueron reproducidos varias veces obteniendo resultados similares (Halberg y Visscher, 1972). Una de las claves fundamentales de una experimentación fiable, es la reproducibilidad de los resultados experimentales obtenidos bajo condiciones estándar. Esta meta, de cualquier forma, no se puede alcanzar aunque se asuma que todas las variables, excepto las investigadas, son las mismas en cada momento convenido, puesto que en el caso de los ritmos con multifrecuencias (varios componentes) cada variable contribuirá en una medición dada, siendo muy improbable que estos estados, de todos los ritmos de multifrecuencia, se reproduzcan cada vez que se repita un estudio dado. Por este motivo es por el que se determina mejor el cronoma (que no la determinación de un sólo valor), o en caso de que no sea posible determinarlo, al menos determinar el componente más prominente del cronoma, como es el circadiano que se mide como parte de una curva mucho más compleja. El principal punto es que una replicación, de un estudio circadiano, es mucho más probable que ocurra, que una replicación de un simple cronoma en un momento dado, sin especificar el tiempo, incluso aunque se especifiquen el momento del día y la estación.

Algunos componentes del cronoma pueden ser determinados en su totalidad mediante la ayuda de monitores automáticos, disponibles actualmente y cada vez más usados en fisiología y biología; por tanto, el tiempo biológico se convierte en una dimensión que puede y debe ser medida. A diferencia del sexo, la especie o la edad,

aisladamente, variables importantes para determinados propósitos, pero para otros pueden ser ignoradas; la información del cronoma es indispensable en fisiología para cualquier determinación completa. En vez de fijar el tiempo del día para eliminar ritmos lo que es una tarea *sisypheana* (absurda), es mejor determinar bioperiodicidades. No sólo debemos tener en mente que un ritmo es un fenómeno formulable algorítmicamente y validable estadísticamente, que caracteriza una variable, sino que es un fenómeno que puede ser determinado de forma efectiva y sin demasiado coste (Cornélissen *et al.*, 1992).

La cronobiología provee conceptos aplicables y técnicas para resolver estos cambios predecibles en los organismos, así como para aislar los efectos ambientales de los mecanismos endógenos. Las propiedades básicas de los ritmos son importantes para la ecología, biología y en particular para la medicina humana y veterinaria.

Las manifestaciones rítmicas de la vida están en desacuerdo con la práctica actual de la medicina, y con el punto de vista, no común, de la homeostasis. Para no desmerecer, la mayoría de lo que se conoce y se puede evaluar en la actualidad, no se debe a los métodos cronobiológicos, y además, las determinaciones experimentales, no relacionadas con el tiempo tienen el principal crédito de que proporcionan beneficios objetivos. La insulina para los diabéticos, así como la penicilina para las infecciones fueron descubiertas sin la ayuda de la cronobiología (en estos casos, p.e., el tiempo de la insulina sería únicamente un refinamiento). Igual que la práctica de la alquimia y la astrología son menos complicadas que la química o la astronomía, respectivamente, la homeostasis también parece menos "complicada" que la cronobiología. Sin embargo, si la fisiología se debe estudiar en su propio margen de variaciones, la cronobiología es la única alternativa a la homeostasis; al principio la cronobiología necesita determinaciones frecuentes y densas durante largos periodos de tiempo, para ir conociendo las diferentes etapas de cada componente del cronoma y creando unos mapas guía; una vez que disponemos de estos mapas, unas pocas o bien muestras aisladas, pueden ser localizadas en el tiempo e interpretadas a la luz de los **cronodesmos** o intervalos de referencia específicos en el tiempo (figura 1).

Figura 1

CRONODESMO

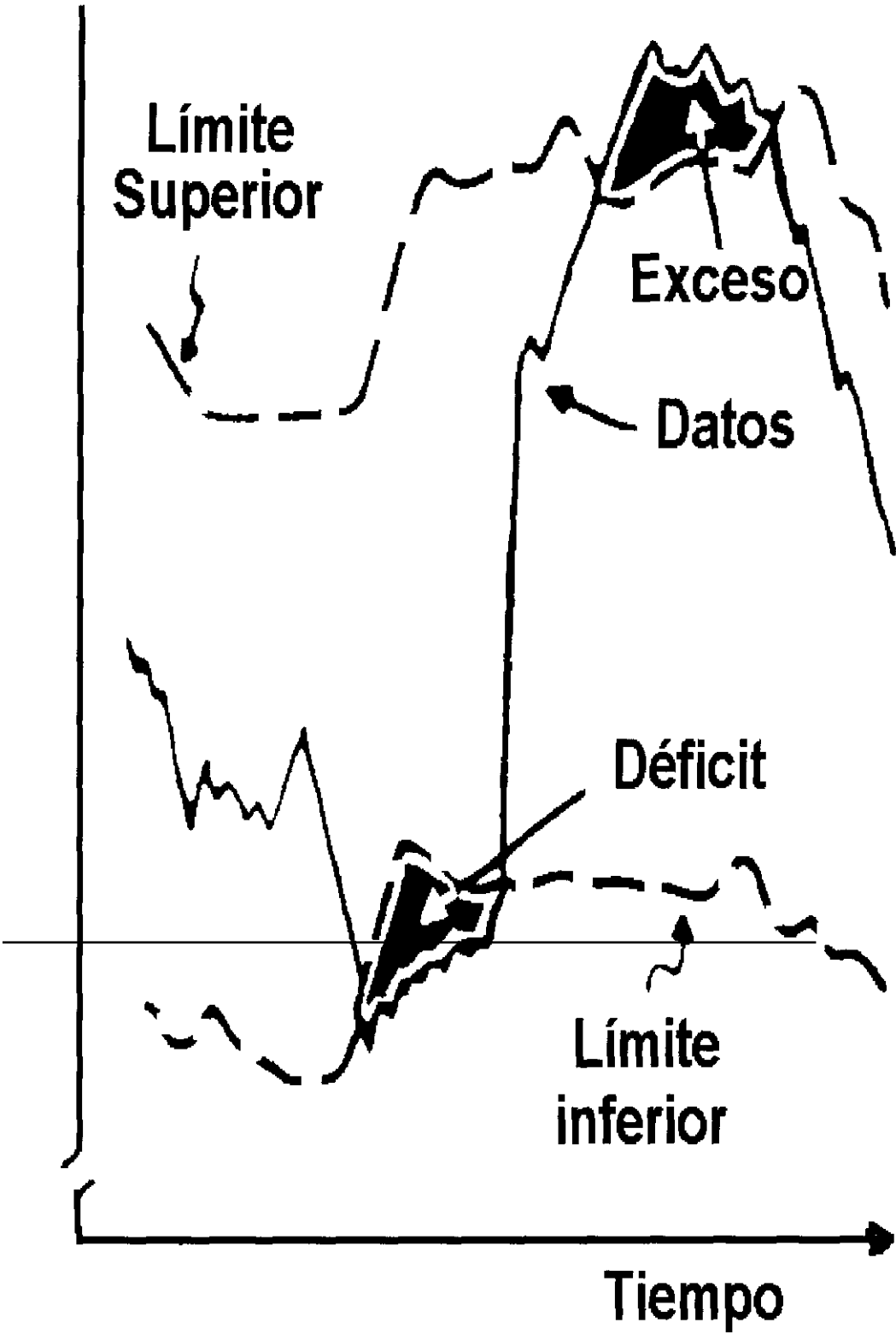


Figura 1

La terminología cronobiológica puede incluso parecer extraña y complicada al principio, pero cada nueva ciencia debe desarrollar sus propios conceptos y métodos. Con el tiempo, el contacto con los métodos analíticos cronobiológicos y su uso, estos términos se vuelven familiares. Originalmente, los métodos de determinación para el estudio de un periodo circadiano se realizaban a mano y se tardaba meses o años. En la actualidad los mismos análisis se realizan en segundos o como mucho en minutos, gracias al uso de los ordenadores.

Los métodos cronobiológicos nos permiten evitar o reducir el riesgo de error, o de falsa información, que los métodos empleados hasta ahora no pueden evitar, incluso fuera del margen fisiológico. Estos métodos actuales, nos limitan a medias e índices de dispersión que no están ligados al tiempo, algunas veces hay errores estándar muy grandes y aún así se acepta un amplio margen normal. La cronofisiología primeramente reduce la extensión del intervalo que se corresponde con el "margen normal" aceptable, y posteriormente resuelve unos nuevos parámetros dinámicos de las variaciones fisiológicas en el tiempo, es decir **los ritmos** (Halberg, 1979). De este modo, no sólo predice cuándo van a ocurrir aproximadamente los valores más altos o los más bajos, en un determinado día, sino también, cuándo van a ocurrir en una semana o año.

El riesgo de elevación de un parámetro puede ser detectado previamente a la aparición de la enfermedad, controlando la alteración que se produce en determinados ritmos marcadores (Halberg, 1974). La cronofisiología ofrece la oportunidad de un tratamiento preventivo a tiempo (Halberg, 1975), a la edad adecuada, que puede ser optimizado mediante mediciones adicionales con nuevos diseños farmacológicos, p.e., a lo largo de escalas circadianas o circaseptanas. La prevención de enfermedades cardiológicas, endocrinas y oncológicas, hasta ahora imposibles de alcanzar, continúa siendo un reto para la investigación, aunque algunas de las ventajas de la cronoterapia de cáncer han sido ya descritas por Halberg y Cornélissen (1992).

VARIACIONES CIRCADIANAS DEL CORTISOL

Pincus *et al.*(1948) describieron cambios de gran magnitud en la excreción urinaria del 17-oxoesteroide y en el recuento de los linfocitos sanguíneos, como una característica exógena, es decir, como respuesta a los cambios de la vida diaria. En contraste, Halberg, basándose en estudios previos de muestreo serialmente dependiente (Halberg y Visscher, 1950), así como en muestreo serialmente independiente (Halberg y Visscher, 1952; Halberg *et al.*, 1951), presentó y documentó el ciclo circadiano adrenocortical como una entidad endógena, que presenta curso libre, al producir una enucleación bilateral del nervio óptico en los ratones (Halberg, 1959, 1969; Halberg *et al.*, 1954, 1959), pero sincronizado por un ciclo que alterna la luz con la oscuridad.

La ACTH es sintetizada de forma circadiana en la adenohipófisis a partir de la proopiomelancortina, la síntesis de esta en las células cromafines de la adenohipófisis está bajo el control de el CRH hipotalámico, que es secretado también con un ritmo circadiano. Esta secreción circadiana no es debida al descenso del cortisol plasmático, sino que es intrínseca al hipotálamo e independiente del control por funcionalidad negativa de los glucocorticoides (López-Calderón, 1992). En humanos se ha visto que el ritmo circadiano de la ACTH persiste en situaciones como una estancia prolongada en la cama, ayuno y en la privación del sueño durante 2-3 días (Delgado, 1992).

En los roedores la producción y/o liberación de los corticoides está sincronizada por el ciclo de luz (L) y oscuridad (O), que alternan, por ejemplo, a intervalos de 12 horas (LO 12:12), pero en las personas la rutina social es el sincronizador, en el que está incluido el encendido y apagado de la luz, en función de un despertador. Pero la corteza suprarrenal secreta glucocorticoides en respuesta a una gran variedad de estímulos estresantes; la respuesta al estrés se produce por la activación de la secreción hipotalámica de CRH, ADH y otras hormonas que estimularán la secreción hipofisaria de ACTH.

¿Se puede demostrar el ritmo circadiano del cortisol plasmático de los conejos, en diferentes ciclos de 24 horas de luz y oscuridad?. Si la contestación fuese afirmativa, mediante la estimación de sus características rítmicas, ¿sería posible explorar la influencia de la duración de la fotofracción (periodo de luz) diaria del ciclo de 24 horas de luz-oscuridad, en la variación circadiana del cortisol plasmático?. Para poder resolver estas dos preguntas se planteó investigar dos grupos de conejos, algunos de los cuales sólo fueron manejados una vez para la extracción de sangre, mientras que los otros estaban sujetos a cinco recogidas de sangre de la oreja, durante 24 horas. En relación al diseño experimental de este estudio, fue interesante determinar en qué medida el manejo de los animales, durante la recogida de sangre (sólo un pinchazo en la vena de la oreja frente a varios pinchazos), influyó en las características circadianas del cortisol, y en relación a esta cualificación metodológica, examinar el papel que juega la duración de la fotofracción respecto al ciclo adrenocortical básico.

Selye, en 1936, observó que cualquier efecto estresante, (al referirnos a estresante no sólo nos referimos a efectos negativos, pues incluso una emoción, aunque sea positiva puede tener el mismo efecto) estimula el eje hipófisis-glándula adrenal, produciéndose ACTH y el consecuente aumento de cortisol; al conjunto de cambios orgánicos que entran en juego como respuesta del organismo ante estos estímulos, Selye lo denominó como síndrome general de adaptación. El cortisol actúa a distintos niveles puesto que casi todas las células orgánicas poseen receptores para glucocorticoides, por lo que éstos tienen acción en la mayoría de los tejidos del organismo. Los glucocorticoides presentan acciones metabólicas, actúan también a nivel del sistema inmunitario, frenándolo: inhibe la liberación de histaminas por las células cebadas y los basófilos, impide la liberación de enzimas proteolíticas y disminuye la formación de fibrina alrededor del área inflamada. Se vio también que existe sincronización entre la eosinopenia cíclica, que ocurre en preparación a la actividad diaria, con el incremento diario de los niveles de hormonas suprarrenales. (Halberg y Chaudhry, 1960).

MARCADORES DE CRECIMIENTO, CA130 y CA125

Una forma de identificar el crecimiento de un tumor es mediante la monitorización de un ritmo marcador como pueden ser la α -fetoproteína o la temperatura del tumor. Los valores más altos se corresponderán con el momento de crecimiento del tumor y, por tanto, con el momento en que el tumor es más sensible a la radioterapia. Mediante la utilización de esta técnica se ha conseguido doblar el porcentaje de supervivencia en personas con tumores periorales (Halberg *et al.*, 1974, 1975). Los ritmos marcadores terapéuticos pueden indicarnos, no sólo el momento correcto de la terapia, sino también nos pueden dar la respuesta al tratamiento.

Se pueden emplear, como ritmos marcadores del crecimiento de un tumor, los marcadores tumorales, que son sustancias producidas por el propio tumor y que nos dan una idea sobre la actividad de ese tumor. Uno de estos "incorrectamente llamados" marcadores tumorales, el CA125, fue descrito por Bast *et al.*, en 1981. Estos autores producían un anticuerpo monoclonal, llamado OC125, el cual reconocía al determinante antigénico CA125 de algunos tumores ováricos, no mucosos. El análisis del CA125 circulante se usa en el diagnóstico y monitorización, así como en el pronóstico, de pacientes con enfermedades ginecológicas.

Como hemos dicho anteriormente: a esos factores se les ha llamado "incorrectamente" marcadores tumorales, porque en su comienzo se determinaron únicamente en pacientes con tumores, pensando que era exclusivo de ellos. Estos factores, CA125 y CA130, no son inherentes a enfermos, sino que se pueden encontrar en personas sanas así como en distintos animales (vacas, conejos, ratas). Y no sólo es propio del género femenino sino que se han localizado también en hombres. Por tanto, estos "marcadores tumorales" deberían ser llamados **marcadores de crecimiento o de proliferación**.

El CA125 presenta unos niveles elevados también en condiciones benignas como son en endometriosis y en inflamaciones pélvicas (Eisermann y Collins, 1989;

Inaba *et al.*, 1989). En condiciones de salud también se han detectado cambios en el CA125 sanguíneo, como es en la gestación, durante la cual la concentración del CA125 circulante está elevada (Haga *et al.*, 1986; Itahashi *et al.*, 1988; Jacobs *et al.*, 1988; Quirk *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1989; Jäger *et al.*, 1990a), sobre todo durante el parto (Touitou *et al.*, 1989) y también en función de la menstruación (Jäger *et al.*, 1988). Un descenso en las concentraciones séricas del CA125 se asoció con una amenorrea inducida mediante fármacos, presumiblemente asociada con la pérdida de actividad hormonal por parte del ovario (Nonogaki *et al.*, 1991). Estos autores relatan el hecho de que existen cambios, de aproximadamente 30 días (ciclotrigintanos), en las series de tiempo del CA125 circulante de una mujer, con una curva de temperatura que sugiere un ciclo ovulatorio. También se ha detectado CA125 en pleura, pericardio, peritoneo y epitelio derivado del conducto mülleriano (endocervical, endometrial y tubal).

Se encontraron grandes variaciones del CA125 sérico a lo largo del día, sin que éstos se pudiesen relacionar con un cambio en el estado del paciente, pero debido a la inconsistencia y/o a los grandes niveles de error de la variación espontánea de CA125 sérico, en pacientes con cáncer de ovario, la búsqueda de otro marcador con un ritmo más prominente pareció interesante, un marcador posiblemente relacionado con el mecanismo de coordinación de la producción de CA125 por el cuerpo, al menos en sitios diferentes del tumor, sobre todo en organismos sanos. La saliva y la orina eran unos candidatos obvios; se examinó la saliva puesto que se había encontrado un ritmo circadiano de gran amplitud en el CA125 salivar de una mujer con un cáncer de ovario (Halberg *et al.*, 1992; Cornélissen *et al.*, 1992). Si el CA125 salivar de una persona sana exhibiese también un ritmo circadiano, las características de este ritmo en ausencia de un cáncer manifiesto podrían servir para controlar su alteración, en caso de un posible riesgo, por ejemplo una elevación del CA125 ó CA130 circulante, previa al desarrollo de un cáncer. Einhorn *et al.* (1990), describieron un caso en el que el CA125 sérico sufrió un aumento varios meses antes de la aparición de la enfermedad.

La posibilidad de determinar el CA125 en saliva, tanto como en suero, fue

demostrada por Chen *et al.* (1990), los cuales, además, trataron de separar pacientes con cáncer de ovario de los controles, en base a un nivel máximo de 3000 U/ml en la saliva recogida por la mañana después del enjuague de la boca.

Si comparamos la saliva con la sangre (plasma o suero), la primera representa un líquido corporal accesible, que además puede conservarse con facilidad, que podemos recoger nosotros mismos sin necesidad de ir al médico y sin necesidad de aparatos especiales. Además, la saliva es un fluido a tener en cuenta, sobre todo, en aquellos pacientes con tumores que presentan disminuidas sus defensas tras varias sesiones de quimioterapia, de forma que, si se deben realizar varias extracciones sanguíneas para controlar la evolución del tumor, se verían privados de las pocas defensas que tienen. Si lo comparamos con la orina, la saliva se almacena más fácilmente en el congelador doméstico, por ejemplo. Por tanto, se debería tener en cuenta la utilización de la saliva como posible fluido para la determinación de distintas variables (Dawes, 1974, 1974b). Katz y Shannon, (1964; 1969a y b), sugirieron el uso de la saliva en el estudio de las hormonas, encontraron que la cantidad de cortisol más corticosterona encontrada en la saliva era igual a la de cortisol más corticosterona en plasma humano y McVie *et al.* (1979), comprobaron que la aldosterona plasmática y salivar estaban totalmente correlacionados. Podemos disponer de la metodología necesaria para este propósito (Walker *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1990), y para determinar cronobiológicamente los estrógenos y progesterona de la saliva, así como otros constituyentes salivares en el curso de los ciclos circaseptanos y/o circatrigintanos.

El CA130 como el CA125, normalmente determinados en suero, presentan una mayor concentración en la saliva, caracterizándose por un ritmo circadiano de gran amplitud, pero el CA130 tiene la ventaja de estar, en unos pocos casos, más correlacionado con el curso clínico del cáncer.

PRESION SANGUINEA Y FRECUENCIA CARDIACA

William Harvey demostró la circulación de la sangre en 1628, pero no describió la fuerza que lanzaba la sangre alrededor del cuerpo. Stephen Hales (1677-1761) midió la diferencia entre la presión cuando el corazón se expande (diástole) y cuando se contrae (sístole), él mismo relató las mediciones directas de la presión sanguínea que realizó en distintos animales, incluidos los caballos (Hales, 1733) cuando exploraba, no la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca, sino sus variaciones a lo largo de la escala de minutos y segundos. Hales midió claramente la presión sanguínea media y describió pequeñas oscilaciones sincronizadas con los latidos del corazón, las cuales estaban superpuestas a unas oscilaciones menores, relacionadas con la respiración.

La variabilidad de la presión sanguínea humana, a lo largo de una escala de 24 horas, fue descrita por Zadek en 1881, y posteriormente, distintos autores citaron esta variabilidad (Howell, 1897; Hill, 1898; Colombo, 1899; Brush y Fayerweather, 1901 y Janeway, 1904, por citar algunos pioneros). Janeway consideró los efectos de algunos factores como las emociones, el ejercicio, la dieta, las horas de sueño e incluso los efectos de la presión atmosférica. De acuerdo con éstos escribió: "En los casos diarios y haciendo referencia especialmente a los efectos del tratamiento en la presión sanguínea, las determinaciones se deben hacer todas a las mismas horas". En 1904 escribió: "Todo el mundo admite la importancia de esto (variabilidad a lo largo de las 24 horas) al estudiar el curso de la temperatura durante las enfermedades". La presión arterial no es menos importante. Corroborado posteriormente, mediante el empleo del método cosenior por Halberg, en 1970, y más tarde estudiado en profundidad por Halberg (1991) y por Cornélissen (1992).

También existe documentación acerca de las variaciones, de aproximadamente un año o circunuales, de la presión sanguínea humana (Schneider y Costiloe, 1972) y su variación con la edad (Halberg, 1970; Halberg *et al.*, 1972; Levine y Halberg., 1972; Bartter *et al.*, 1976; Sothorn y Halberg, 1986), documentadas en parte mediante un

muestreo longitudinal en la misma persona.

Con la disponibilidad actual de nuevos instrumentos para registrar la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca, tanto en medicina humana como veterinaria, así como por los análisis cronobiológicos, se deben aplicar los conceptos de la cronobiología; enfocados no solamente a índices estadísticos, sino a los dinámicos de la presión sanguínea en la práctica diaria. Por ejemplo, podemos citar que en un perfil cardiovascular de 24 horas, bajo unas condiciones de control clínico totales, la presión diastólica mayor, normalmente excede a la presión sistólica menor, incluso después de eliminar algunos valores que podían parecer errores instrumentales.

Actualmente, disponemos del material necesario para determinar la variación circadiana así como otros componentes, por tanto mediante la combinación de un moderno "software" y "hardware", los parámetros de las variaciones circadianas pueden ser determinados y aprovechados.

DISEÑO EXPERIMENTAL

La mayoría de los clínicos y de los investigadores involucrados en investigaciones biológicas están dándose cuenta, ahora, que los sistemas biológicos tienen una estructura temporal, en la cual bastantes, si no todas, las variables exhiben fenómenos oscilatorios; estos cambios son los ritmos biológicos. Dentro de estos ritmos, el que mayor atención ha suscitado es el ritmo circadiano (Halberg, 1959), y para determinar estas bioperiodicidades circadianas y otras, como las circaseptanas, circatrigintanas o circanuales debemos tener un diseño experimental específico.

El diseño experimental de la investigación va a determinar que los datos recogidos tengan o no utilidad, únicamente la tendrán si se recogen en función del tiempo. Debe estar basado en algún conocimiento de la estructura temporal del animal en general, y en la bioperiodicidad que va a ser estudiada en particular. Un diseño experimental, que envuelve funciones que cambian con el tiempo, debe estar basado en unos sólidos conocimientos cronobiológicos. La información estadística obtenida de los diseños experimentales, puede ser evaluada y cuantificada mediante ritmometría estadística; ésta debe compensar al menos para algún tipo de valores inusuales, separando la información del ruido. Pero la ritmometría no es un sustituto, como tal, de datos recogidos de forma inadecuada.

En los estudios con un sólo animal o bien en el de poblaciones, el muestreo cronobiológico se debe llevar a cabo bajo condiciones estandarizadas, como son los ciclos de luz-oscuridad, la hora de las comidas, la temperatura y la humedad relativa del aire, de la habitación y el manejo del animal, el cual es una variable importante a tener en cuenta cuando se estudian algunas variables relacionadas con el estrés (p.e., cortisol).

Cuando se trabaja en investigaciones experimentales, los animales deben estar estandarizados al menos durante las dos semanas previas al estudio, en un ciclo de luz artificial, en el que se alternen las horas de luz y las de oscuridad, con un horario

"acceptable" para el organismo en estudio y que se encuentre reconocido como sincronizador para determinadas especies y condiciones. El ciclo puede consistir en 12 horas de luz alternando con 12 horas de oscuridad (LO 12:12), o un ciclo de luz diferente de acuerdo con el propósito deseado; por ejemplo, en experimentaciones sobre reproducción emplearíamos el ciclo 14:10, Silván *et al.* (1990), pues es con el que se obtienen mejores resultados. Se sabe que, bajo determinados ciclos de luz-oscuridad, el ciclo circadiano de algunas hormonas cambia.

El ciclo de luz elegido debe estar claramente indicado en cualquier estudio, así como el momento en que se enciende y se apaga la luz, y también el momento exacto en que se recogen las muestras o se administran los fármacos.

Una experimentación llevada a cabo a una determinada hora, puede definirse por su relación con el ciclo de luz-oscuridad (LO). Las cuatro referencias de luz-oscuridad son: HALO que significa horas después de encender la luz (Hours After Light Onset), HAML: horas después de la mitad del intervalo de luz (Hours After Mid Light), HADO: horas después del comienzo de la oscuridad (Hours After Dark Onset) y HAMD: horas después de la mitad del intervalo de oscuridad (Hours After Mid Dark). Por ejemplo: bajo un régimen de LO 14:10 con luz desde las 08:00 hasta las 20:00 horas, se recogieron muestras a las 2, 6, 10, 14, 18 y 22 HAMD.

Si realizamos la experimentación tomando el ciclo luz-oscuridad como tiempo de referencia, en lugar de tomar la medianoche, podremos ahorrar tiempo y espacio; por ejemplo, tenemos 6 lotes de animales en los cuales queremos determinar, cuál es el momento óptimo de utilización de un fármaco. Mediante el empleo de un diseño experimental cronobiológico (Halberg y Halberg, 1980), en el cual hemos tomado como tiempo de referencia HALO (horas después de encender la luz), administraremos el fármaco a lo largo de las 24 horas del día y a intervalos iguales (p.e., cada 4 horas), el primer lote lo recibiría, 2 horas después de encender la luz, es decir 2 HALO, el lote 2: 6 HALO, el lote 3: 10 HALO, el lote 4: 14 HALO, el lote 5: 18 HALO y el último lote (6): 22 HALO, es decir 22 horas después de encender la luz.

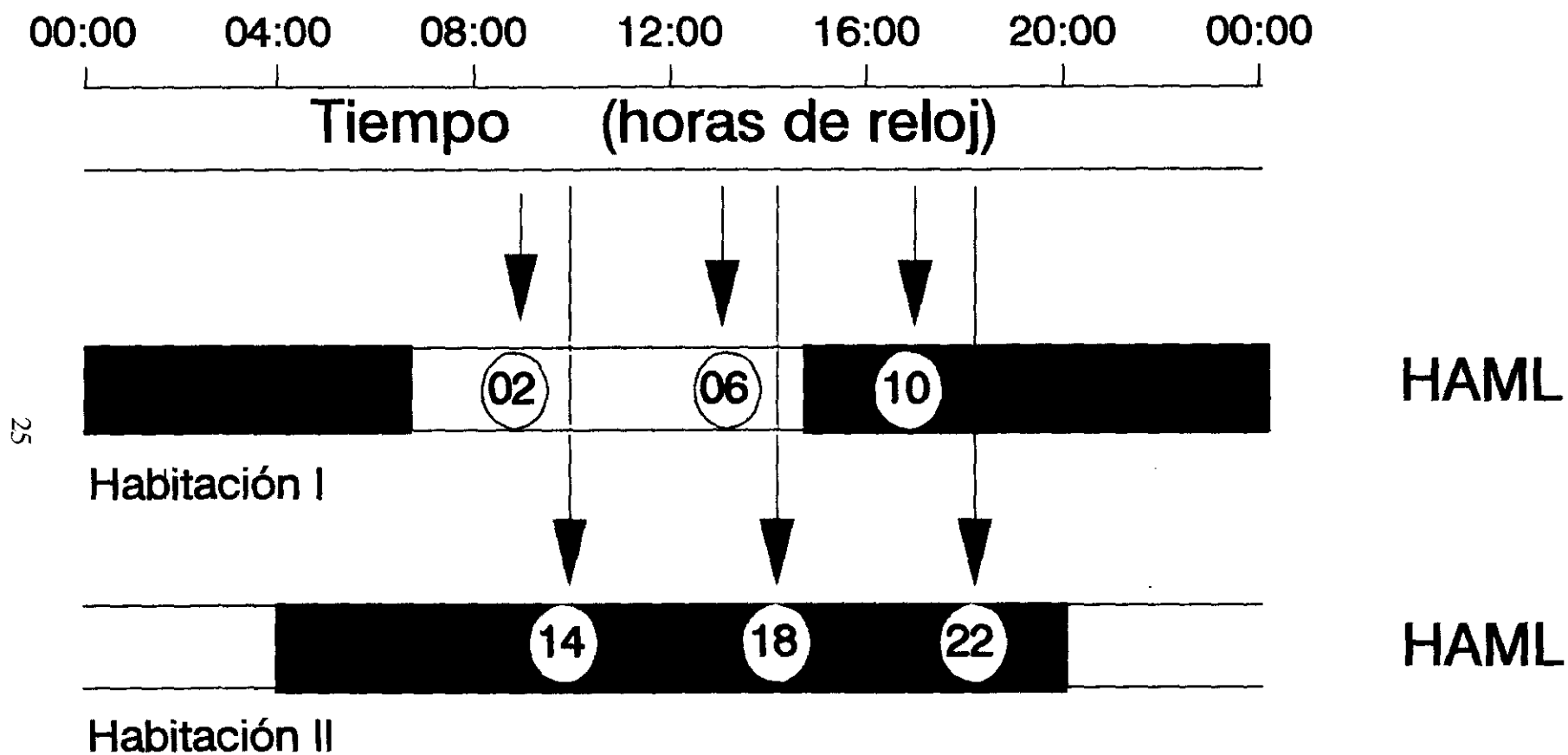


Figura 2

En lugar de tener que establecer turnos para la administración del fármaco a lo largo de todo el día, los lotes de animales se podrían distribuir en 2 habitaciones, I y II, con el mismo ciclo de luz-oscuridad por ejemplo LO 08:16; la diferencia estaría en que en la habitación I, la luz se encendería a las 07:00 y se apagaría a las 15:00 y en la habitación II, la luz se encendería a las 20:00 y se apagaría a las 4:00. Los lotes 1, 2 y 3 se alojarían en la habitación I y los lotes 4, 5 y 6 en la habitación II. Mediante este diseño el trabajo (recogida de muestras o administración de fármacos) quedará reducido (condensado) a 3 momentos escasos del día. El lote 1 y el lote 4 se sangrarán a las 09:00 y a las 10:00 horas, los lotes 2 y 5 a las 13:00 y 14:00 horas, y los lotes 3 y 6 a las 17:00 y 19:00 horas (figura 2).

Los resultados anteriores podrían referirse también, a HAML, HADO ó HAMD.

El modelo se podría complicar con más habitaciones e incluso con diferentes ciclos de luz-oscuridad, emplearíamos mayor número de animales pero minimizaríamos el trabajo.

El mes y el año del estudio deben estar indicados, puesto que las variaciones circatrigintanas y circanuales pueden caracterizar el MESOR y la acrofase de una función circadiana (Haus y Halberg, 1970), también se deberían especificar la localización donde se ha realizado el estudio. Se deben evitar las interrupciones e interferencias con los animales antes y durante el estudio experimental cronobiológico, como pueden ser las temperaturas extremas; así como cualquier variación o disturbio en la habitación de experimentación.

El horario de alimentación de los animales debe de detallarse en cada estudio (*ad libitum*, sin comida, sin agua o con restricción de comida); sobre todo cuando se están llevando a cabo estudios sobre los efectos de algún fármaco puesto que, como es sabido, algunos fenómenos bioperiódicos, como los ciclos de sensibilidad-resistencia, pueden presentar una acrofase en movimiento debido al momento de la ingestión de la comida.

Estas referencias biológicas indican algunos aspectos de la sincronización animal y pueden ser críticas, sobre todo si se limita el muestreo a una sólo toma o a únicamente unas cuantas. Otras funciones de referencia posibles, que deben ser consideradas como ritmos marcadores en el dominio circadiano, son: la temperatura corporal, los electrolitos salivares (sobre todo sodio y potasio), el volumen urinario y los corticosteroides, aunque cualquier otra variable puede servir como una posible función de referencia. Preferentemente, se debe medir longitudinalmente a intervalos frecuentes y ser determinada mediante métodos no invasivos, si bien las variables que se puedan determinar automáticamente y detectar de forma fácil son las más atractivas, como la telemetría de la temperatura corporal, de la frecuencia cardíaca o de la presión sanguínea.

Cada día se está mejorando la tecnología para la recogida automática de muestras y su transferencia directa al ordenador para analizarlas mediante ritmometría. El uso de este muestreo automático se hace necesario para evitar interferencias con los animales que estén envueltos en la experimentación (Halberg *et al.*, 1971; Runge *et al.*, 1974; Smith *et al.*, 1978). Cuando no se dispone de esta instrumentación para realizar una recogida de datos automática, se puede utilizar como ritmos marcadores las mediciones manuales de algunas de las funciones corporales de los animales en estudio y posteriormente aplicar los métodos cronobiológicos.

Las necesidades de un muestreo correcto son considerablemente importantes para demostrar un ritmo de periodo desconocido, especialmente si no se cuenta con él. La búsqueda de bioperiodicidades desconocidas puede estar apoyada por el conocimiento de ritmos ambientales (como el ciclo de luz-oscuridad) que rodean esas bioperiodicidades y que sirve de **sincronizador** de los ritmos biológicos; pero también debemos tener en cuenta en qué medida la interferencia que ejerce el investigador, o el diseño del estudio, o su naturaleza, nos conducen a una bioperiodicidad de curso libre, de ese supuesto sincronizador.

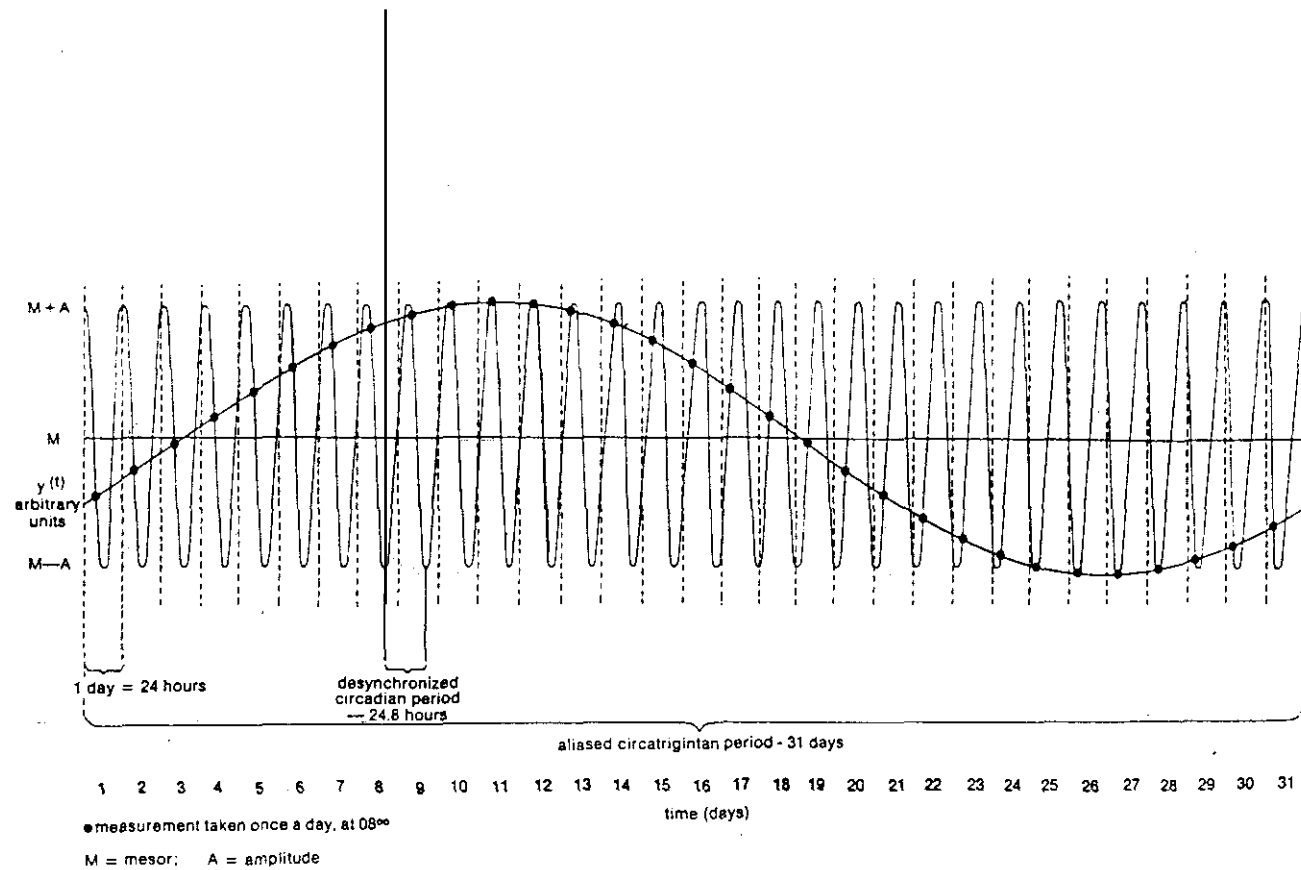
La longitud del periodo de observación que se necesita, depende de la región

espectral (circadiano, circaseptano, etc.) y de las características del ritmo que se va a estudiar. Una de las elecciones puede ser el seguimiento de un sólo animal a lo largo de un espacio de tiempo (a lo largo de varios periodos del ritmo, p. e., el efecto de los fármacos en el tiempo) o también llamados **estudios longitudinales**. Varios animales que exhiben el mismo ritmo pueden ser estudiados a través de un sólo periodo o de varios periodos en un **diseño transverso**, o bien un número definido de animales pueden ser seguidos a través de varios periodos en un **diseño híbrido o mixto** (Halberg, 1964).

El intervalo entre observaciones consecutivas debe ser lo suficientemente corto para obtener un resultado seguro del ritmo que va a ser estudiado, y para evitar el **bioaliasing** (Engeli y Halberg, 1964; Bunning, 1973; Halberg *et al.*, 1977) por alguna componente de alta frecuencia, figura 3. Para evitar este bioaliasing el muestreo debe de hacerse a intervalos lo suficientemente cortos para resolver algunos ritmos con relativas altas frecuencias, y durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo, para obtener algunos de los componentes de alta frecuencia. La obtención de muestras durante largos periodos de tiempo son de crucial importancia, con el uso del registrador automático se evitan las limitaciones que existían en la recogida de datos y posteriormente se reducirá el coste de los estudios cronobiológicos. En algunos análisis (p.e., químicos) las muestras han de elegirse oportunamente, más que por conveniencia.

En España sabemos que una investigación cronobiológica a nivel de campo, hoy en día es muy complicada, puesto que no le podemos decir al ganadero que recoja sangre de sus animales cada 4 horas o que se levante a las 3 de la mañana a recoger una muestra o bien que le administre la comida a determinada hora, aunque con esto, el animal aumente el índice de transformación (Sundaraj y Halberg, 1982). Los diseños cronobiológicos pueden mejorar la interpretación de los resultados, por ejemplo cuando medimos una variable fisiológica, como la presión sanguínea o el cortisol, ambos caracterizados por una gran amplitud circadiana, si ignoramos esta estructura temporal, tomando las muestras sin especificación del tiempo, p. e., desde las 09:00 hasta las 17:00 horas (suelen ser las horas de consulta, sin detallar la hora

Figura 3



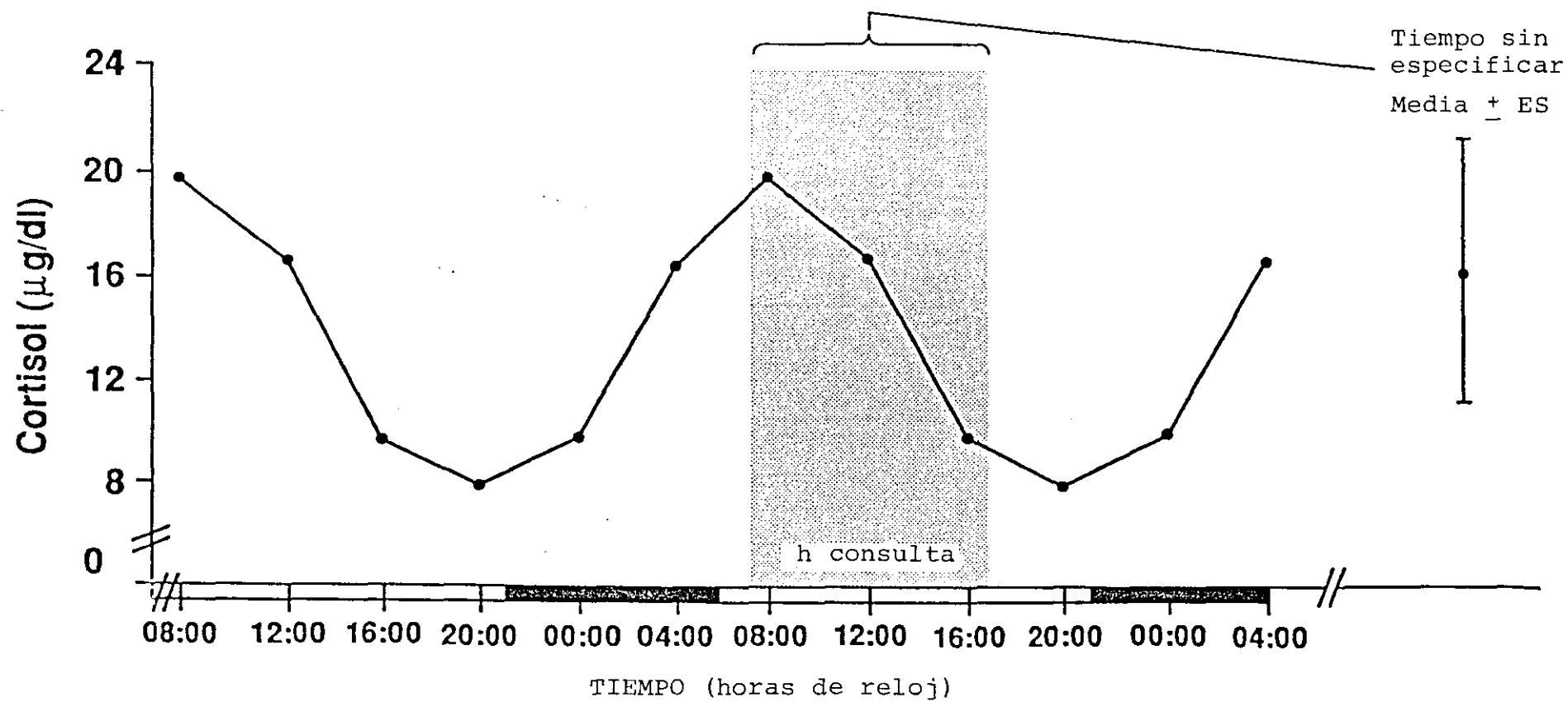
exacta), ésto nos conducirá a unos valores medios que están asociados a un gran índice de dispersión, ya que la mayor parte del margen de variación predecible asumido por la variable fisiológica está cubierto por el intervalo de observación (figura 4). Si se toman muestras aisladas de la misma variable e ignoramos los tiempos del muestreo, nunca nos daremos cuenta de que, respecto de la referencia estándar de un individuo, el mismo valor será unas veces muy alto, en un momento dado, y muy bajo, en otro, pero perfectamente aceptable en algunos momentos.

Es cierto que la elección de dos tiempos de recogida de muestras, justo antes de que se produzca el máximo y el mínimo (figura 5, superior), asumidos por las variables rítmicas, es óptimo únicamente en el caso de que conozcamos aproximadamente cuando se van a producir éstos. Pero si las dos muestras se recogen, sin darnos cuenta, en los puntos de inflexión de las curvas, no se encontrará ninguna diferencia y se obtendría una conclusión errónea (figura 5, inferior). Pero si después de un diseño inicial de 6 puntos, se eligen dos momentos de obtención de muestras, se obtendrán resultados coincidentes con el empleo de seis puntos (Halberg y Visscher, 1950; Cavallini *et al.*, 1987; Blank *et al.*, 1992), aunque el uso de estos dos momentos de muestreo a priori se desaconsejan totalmente.

La consideración, en el diseño, de un tercer momento de recogida de muestras nos da el punto de estimación de las características de los ritmos (figura 6, superior). Con sólo tres momentos de recogida de muestras, podemos estimar las características de un ritmo, pero no son suficientes para realizar pruebas de hipótesis o estimar límites de confianza. De cinco a ocho momentos de recogida de muestras distribuidos de forma equidistante a lo largo de un ciclo, constituyen detallados y potentes diseños (Hillman *et al.*, 1990; Bingham *et al.*, 1992) que permiten la realización, tanto de la detección de un ritmo, como la estimación de parámetros con una cierta medida de incertidumbre (figura 6, inferior).

Lo mencionado anteriormente, en cuanto a la toma de muestras para la detección de bioperiodicidades, puede aplicarse también a la valoración del efecto de un fármaco, desde el momento en que podemos hacer corresponder los máximos y

Figura 4



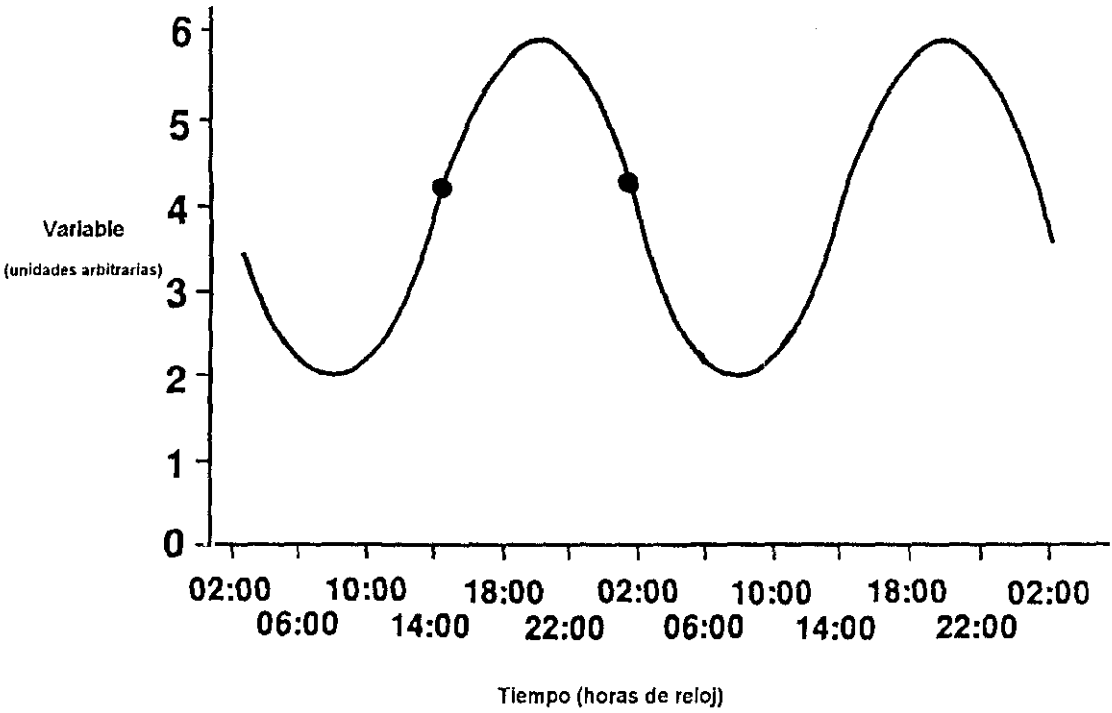
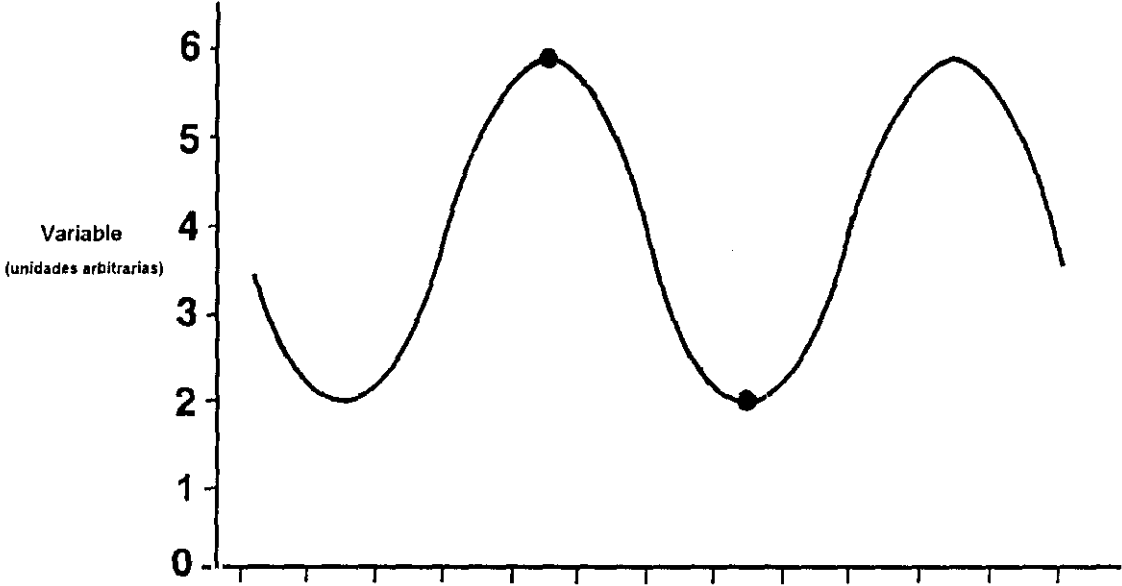


Figura 5

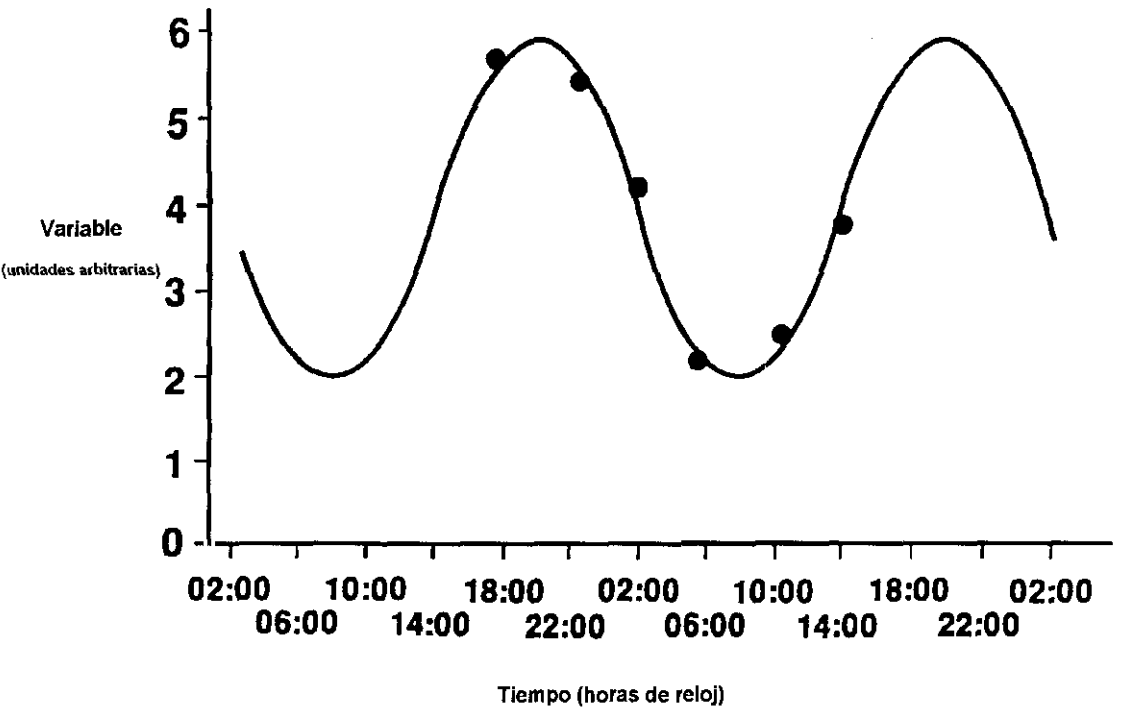
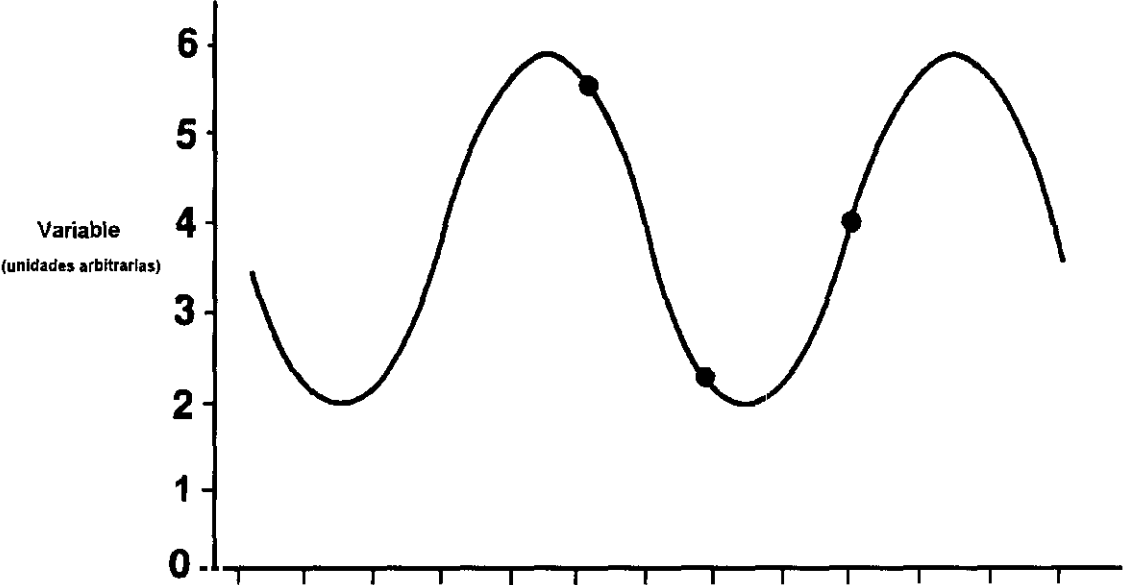


Figura 6

mínimos con un efecto deseado y un efecto no deseado en la acción de ese fármaco y, asignando los anteriores puntos de recogida de muestras, al control del mismo en distintos momentos del día y a diferentes animales, puesto que a dosis iguales de un fármaco, éste producirá efectos diferentes dependiendo del momento de administración. Por ejemplo, en caso de querer conocer cuál es la mejor hora de administración de un fármaco que disminuye la frecuencia cardiaca, inocularíamos a cada animal la misma dosis pero a distintas horas, obteniendo a veces una respuesta circadiana, correspondiéndose el efecto positivo del fármaco con el mínimo de la curva y el efecto negativo con el máximo de la misma, al no disminuir la presión sanguínea sino aumentarla.

En cronobiología, la elección de los procedimientos de recogida de muestras constituye una importante consideración en el diseño experimental. Cualquier interferencia con el animal, debido a las técnicas empleadas para realizar las mediciones de un determinado parámetro, pueden conducirnos a cambios puramente artificiales de la función estudiada. Un aspecto muy importante de las reacciones que se producen, debido a los trastornos del sangrado, es la observación de los ciclos circadianos de susceptibilidad y resistencia, no sólo ante numerosos agentes físicos y químicos, nocivos y tóxicos, sino a simples procedimientos como el manejo, las mediciones de temperatura rectal o inoculaciones de sueros salinos (Smolensky *et al.*, 1978). Este problema se vuelve incluso más complejo, si se deben hacer varias determinaciones en el mismo animal (**muestreo serialmente dependiente**). Parece deseable utilizar cada animal, sólo una vez en cada toma de muestra, si el proceso de obtención de muestras produce interferencias con el sujeto estudiado, (**muestreo serialmente independiente**). Esto requiere la disponibilidad de un adecuado número de animales comparables en sexo, edad, antecedentes genéticos y pasado histórico, lo que es más fácil cada día en determinadas especies animales, debido a la mayor disposición de estirpes consanguíneas; pero, en determinados estudios, se puede evitar al sustituir el estrés que produce la recogida de muestras sanguíneas, por el uso de otros fluidos biológicos como son la saliva o la orina. Por todo lo citado anteriormente, en la experiencia animal el estudio del diseño cronobiológico es esencial para una buena práctica de laboratorio.

Toda esta información cronobiológica, disponible en la actualidad, indica que los diseños cronobiológicos se han vuelto requisitos previos esenciales en el estudio de tejidos celulares de sujetos, así como en los estudios de poblaciones. A la estructura del organismo, en el espacio, hay que añadirle la estructura en el tiempo, a la cual llevamos haciendo referencia desde el principio de este trabajo; aunque tan importante es cuándo ocurre un fenómeno biológico, como dónde, cómo y por qué, puntos que tendremos que tener en cuenta a la hora del diseño e interpretación de los resultados obtenidos.

Los **cronodesmos** o valores de referencia en el tiempo son muy útiles cuando definimos la normalidad y la salud, si medimos la presión sanguínea en una persona a las 08:00 de la mañana, será más baja que si la medimos por la tarde, estos dos valores están dentro del margen de la normalidad y están dentro de los límites referidos en los cronodesmos, pero para un investigador que no sea cronobiólogo, el valor determinado a las 20:00 horas estará dentro del margen de la hipertensión. Las alteraciones de la estructura temporal de un organismo podrían ser una señal temprana de alguna posible disfunción, anterior al desarrollo de una enfermedad; p.e. si registramos, mediante telemetría, la temperatura corporal en una vaca, una elevación de la misma podría ser un signo temprano de infección -mastitis-, (Lefcourt, 1983, 1990).

De igual importancia para la obtención de unos resultados con sentido, es el poder familiarizarse con la metodología de las investigaciones cronobiológicas y con las necesidades de un muestreo para cada margen de frecuencias estudiadas (Halberg y Panofsky, 1961; Panofsky y Halberg, 1961; Halberg *et al.*, 1964). Finalmente, los datos obtenidos deben ser analizados por métodos de deducción estadística de ritmometría cuantitativa; esto nos permitirá resolver la compleja y dinámica estructura temporal de los animales y nos conducirá hacia unos resultados finales (puntos e intervalos) para que los parámetros de los ritmos puedan ser estudiados.

Al hablar del coste de los diseños experimentales cronobiológicos, la mayoría de las personas tiene un concepto erróneo de ellos. Actualmente, el coste de un

estudio cronobiológico es decididamente menor que el de los diseños tradicionales. Son más baratos porque son mucho más efectivos, proveen mucha más información y en el caso de control de fármacos, por ejemplo, nos permiten conocer el efecto opuesto en diferentes tiempos o bien nos permiten conocer la forma de mejorar un efecto deseado. También nos puede llevar a reducir la toxicidad: los tratamientos con quimioterápicos no se emplearían en determinados momentos para evitar el efecto tóxico. La quimioterapia administrada en pacientes con cáncer se realiza, en la actualidad, continuamente durante 24 horas, durante este periodo la quimioterapia actúa "matando" células tumorales, pero también células sanas, como son los linfocitos o las células de la médula ósea, dejando al paciente, muchas veces, en peores condiciones. Mediante el control de los momentos de crecimiento del tumor, y con el uso de ritmos marcadores (como la temperatura en tumores accesibles o los marcadores tumorales en los no accesibles), se trataría con quimioterapia únicamente en los momentos de crecimiento del tumor. Por tanto, el elevado coste de los experimentos cronobiológicos es un concepto erróneo, puesto que todo lo que se haga sin especificación de tiempo, se debe repetir a diferentes tiempos.

El poder de los cálculos analíticos usados en el método cosenior revela que con tan sólo 8 sujetos estudiados, en 6 momentos equidistantes del ritmo, son suficientes para determinar las características de ese ritmo cuando la relación señal-ruido es 2 ó mayor, con un 80% de poder, aproximadamente (Cornélissen *et al.*, 1992). Para traducir estos resultados a coste, el método cronobiológico propone tomar el número inicial del tamaño de la muestra, pero distribuyendo cada sujeto en diferentes tiempos. La experiencia de varios autores y la simulación de análisis, sugieren que aproximadamente 6 momentos de recogida de muestras, distribuidos de forma equidistante a lo largo de un ciclo del ritmo investigado, nos conducirán a la obtención de buenos resultados. Por tanto, como hemos visto, el método cosenior de los diseños cronobiológicos presenta diferentes ventajas, como son la necesidad de un menor número de animales, y un mayor poder que los métodos estadísticos convencionales (Bingham *et al.*, 1992), y a la larga un menor coste, puesto que no se necesitaran posteriores repeticiones a diferentes horas cuando se realicen pruebas de control.

ANALISIS DE DATOS EN CRONOBIOLOGIA

La aplicación de la cronobiología, dependerá fundamentalmente de la evaluación cuantitativa de los datos recolectados en función del tiempo, mediante los métodos ritmométricos y el empleo de una buena base de datos.

Pasamos a describir a continuación los diferentes métodos analíticos empleados en cronobiología, para poder llevar a cabo estudios cronobiológicos correctos.

La dificultad de interpretar los datos, de una forma puramente global, se debe al hecho de que el clásico pensamiento de la homeostasia está enfocado exclusivamente, en índices medios de localización o dispersión de datos, sin ninguna consideración explícita, de alguna de las diferencias que pueden existir en la dinámica de dos grupos, que presenten medias y desviaciones estándar similares, cuando no idénticas (Halberg *et al.*, 1990).

La cronobiología no sólo añade un enfoque a la dimensión de la variabilidad, sino que, en vez de dejar ésta sin resolver, los investigadores que se ocupan del estudio de la cronobiometría dividen el margen normal, obteniendo así nuevos parámetros que proporcionan un método de reducción de datos, obteniendo mucha más información de la que se obtiene con el margen normal, al igual que los físicos dividieron el átomo, que una vez se creyó indivisible (como está implícito en el origen de su nombre). El análisis de los ritmos, podría ser equiparado a la fisión por la obtención de grandes beneficios: uno por la producción de estos nuevos parámetros y el otro por la producción de grandes cantidades de energía.

Volviendo a la analogía anterior, la fusión de partículas produce incluso mucha más energía que la fisión; igualmente el estudio de las relaciones entre ritmos, equivalente a la fusión, provee de una información adicional en una aproximación integrativa, para relacionar las características entre unos ritmos y otros, y con las de otros resultados clínicos.

La detección de un componente dado requiere, al menos, reunir los datos y calcular la media; pudiéndose detectar entonces el efecto del tiempo, pero aún existe la necesidad adicional de una reducción temporal de los datos, en parámetros con pleno significado, ello requiere "herramientas" especiales, como es un ordenador con el adecuado "software", al igual que se necesitan instrumentos especiales para "ver" las frecuencias de las ondas electromagnéticas que están fuera del margen visible, u otro tipo de ondas como las de radio o rayos X.

A simple vista se pueden observar muchas cosas, pero no todas. La vista no puede reemplazar al microscopio para observar la célula, de la misma forma que no se pueden reemplazar los ordenadores para cuantificar un ritmo.

La alternativa cronobiológica consiste en obtener mediciones en serie de forma sistemática (antes de cualquier estudio o diagnóstico) y analizar estas series de datos para determinar los parámetros predecibles de las variaciones de los mismos. Los procedimientos y estudios cronobiológicos son necesarios para reducir a simples términos la esencia de algunos datos complejos.

Los datos pueden parecer irregulares y, como dijimos al principio, pueden no ser cuantificados a simple vista, pero esto se soluciona fácilmente con el uso de los ordenadores. Una primera aproximación es la resolución de un ritmo circadiano, mediante el empleo del método cosenor, lo que implica ajustar una curva coseno de 24 horas a los datos, a través del método de los mínimos cuadrados. Se obtienen entonces estimaciones del MESOR, media ajustada al ritmo, de la amplitud y acrofase circadianos, que son medidas de la duración y momento del cambio que se produce en el día y que es predecible. Estas características de los ritmos están ilustradas en la figura 7, junto con el periodo, duración de un ciclo completo, obtenido mediante métodos de cronobiometría (Halberg, 1980) con estimación de un error. El método cosenor se explicará posteriormente con mayor precisión, al igual que las características de los ritmos que de él se deducen.

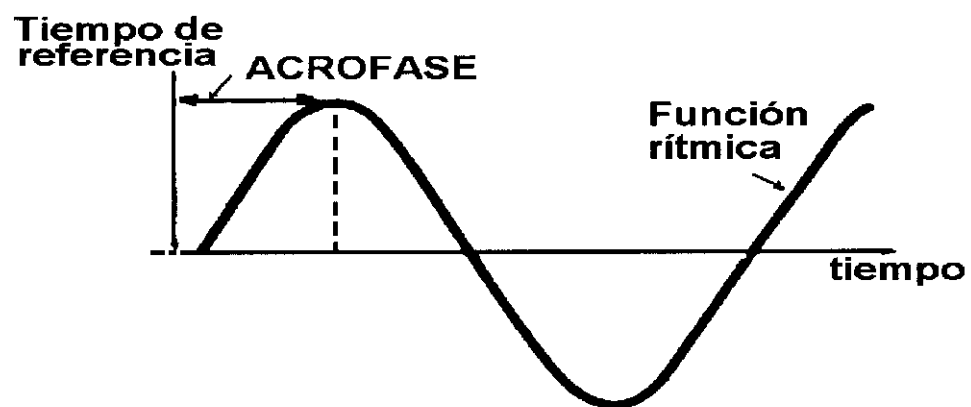
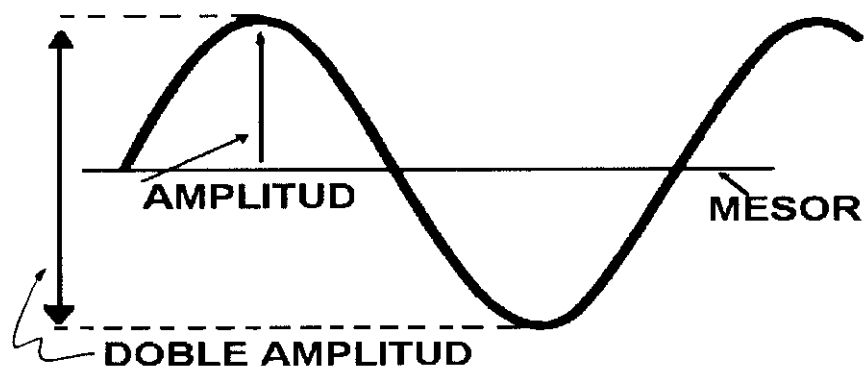
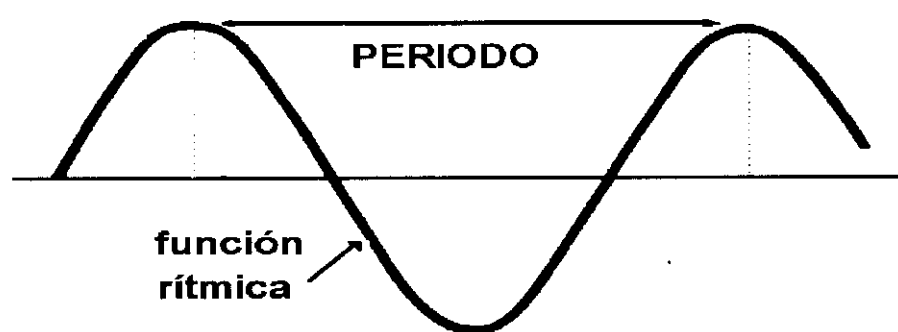
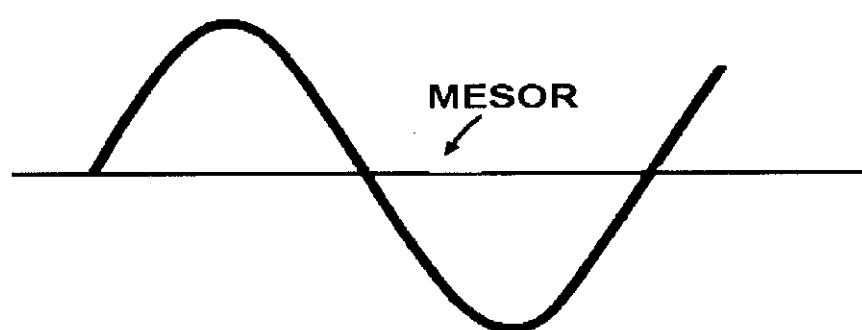


Figura 7

Siempre es deseable cuantificar la dinámica de cualquier cambio, mediante la estimación de la extensión y el momento de ese cambio, ambos determinados mediante el método cosenior como parámetros de los ritmos. Halberg, en 1969, dijo que la cronobiología sirve para evitar errores, cuantificar nuevos parámetros y para decidir los momentos oportunos de los muestreos, bien mediante la toma de muestras aisladas o bien mediante series de datos (Halberg, 1969; Halberg, 1980).

La aplicación de la cronobiología y sus conceptos a la medicina humana y veterinaria, depende fundamentalmente de una evaluación cuantitativa de los datos recogidos en función del tiempo. Sólo se podrá obtener una información cuantitativa de los ritmos si disponemos de una base de datos adecuada, y si las series de datos biológicas, normalmente contaminadas, se analizan mediante métodos de ritmometría, estadísticamente deducible, que también separan el ritmo del ruido. Estos métodos han sido desarrollados y mejorados como técnicas rutinarias de ordenador durante las pasadas décadas (Panofsky y Halberg, 1961; Halberg y Panofsky, 1961; Halberg *et al.*, 1965; Bunning *et al.*, 1973). Parte de la metodología ritmométrica básica ha sido incluso adaptada para su uso con ordenadores portátiles y pequeñas calculadoras (Cornélissen *et al.*, 1980).

Para que una función fisiológica se pueda considerar como rítmica, el acontecimiento, el intervalo y las secuencias no necesitan repetirse exactamente, aunque deben mostrar alguna regularidad de repetición. Para ser calificadas como ritmos, esta regularidad debe tener un patrón identificable, y debe mostrar que su ocurrencia no se debe al simple azar.

Para detectar bioperiodicidades en series de tiempo cortas, sin tener en cuenta el problema de los datos no equidistantes (problema común en muchos análisis) se desarrolló el modelo cosenior (Halberg, 1969). Este es un método bastante atractivo y que ha sido usado ampliamente por su simplicidad, versatilidad y la sugestiva presentación de los resultados analíticos. El método cosenior simple consiste en ajustar, mediante mínimos cuadrados, una función coseno a los datos, asumiendo que se conoce el periodo, τ . El modelo es el siguiente:

$$Y(t) = M + A \cos \left(\frac{2\pi t}{\tau} + \phi \right)$$

El ajuste de un sólo componente, p.e., 24 horas (figura 7) se caracteriza por tres parámetros: el **MESOR (M)**, (medialínea del ritmo estimada estadísticamente) o media ajustada al ritmo; la **amplitud (A)**, medida de la extensión del cambio predecible, alrededor del MESOR, en un ciclo; y la **acrofase (ϕ)**, medida del momento en el que se producen casi todos los valores más altos recurrentes en cada ciclo.

Cuando los datos no son equidistantes y/o cubren sólo una parte del ciclo, el MESOR puede ser diferente de la media aritmética, y normalmente proporciona una estimación más exacta (menos desviada) del valor medio asumido por la variable rítmica. Cuando los datos son equidistantes y cubren un número entero de ciclos, el MESOR es idéntico a la media aritmética, pero está asociado normalmente a un error estándar menor. Por tanto, normalmente el MESOR es más preciso que la media aritmética (Halberg, 1989; Cornélissen *et al.*, 1992) (figura 8).

Si comparamos la doble amplitud de la función ajustada, como una medida de la extensión del cambio del ritmo, esta puede ser considerablemente diferente del margen general de los datos (figura 8).

El momento de los valores máximos no se puede comparar con la acrofase, al ajustar la función a los datos, la acrofase del ritmo estimada puede diferir considerablemente, en tiempo, de un valor extremo fortuito e influenciado (figura 8).

La acrofase también puede ser definida como el retraso que existe desde un tiempo de referencia dado, hasta que se produce el pico en el tiempo de la función coseno ajustada a los datos; los tiempos de referencia más usados incluyen: la medianoche local para los ritmos circadianos, el domingo para los ritmos circaseptanos y el 22 de diciembre precedente a los datos recogidos, para los ritmos circanuales (figura 9). Si empleamos los tiempos de referencia anteriormente citados, la acrofase

VENTAJAS DE LA RITMOMETRIA

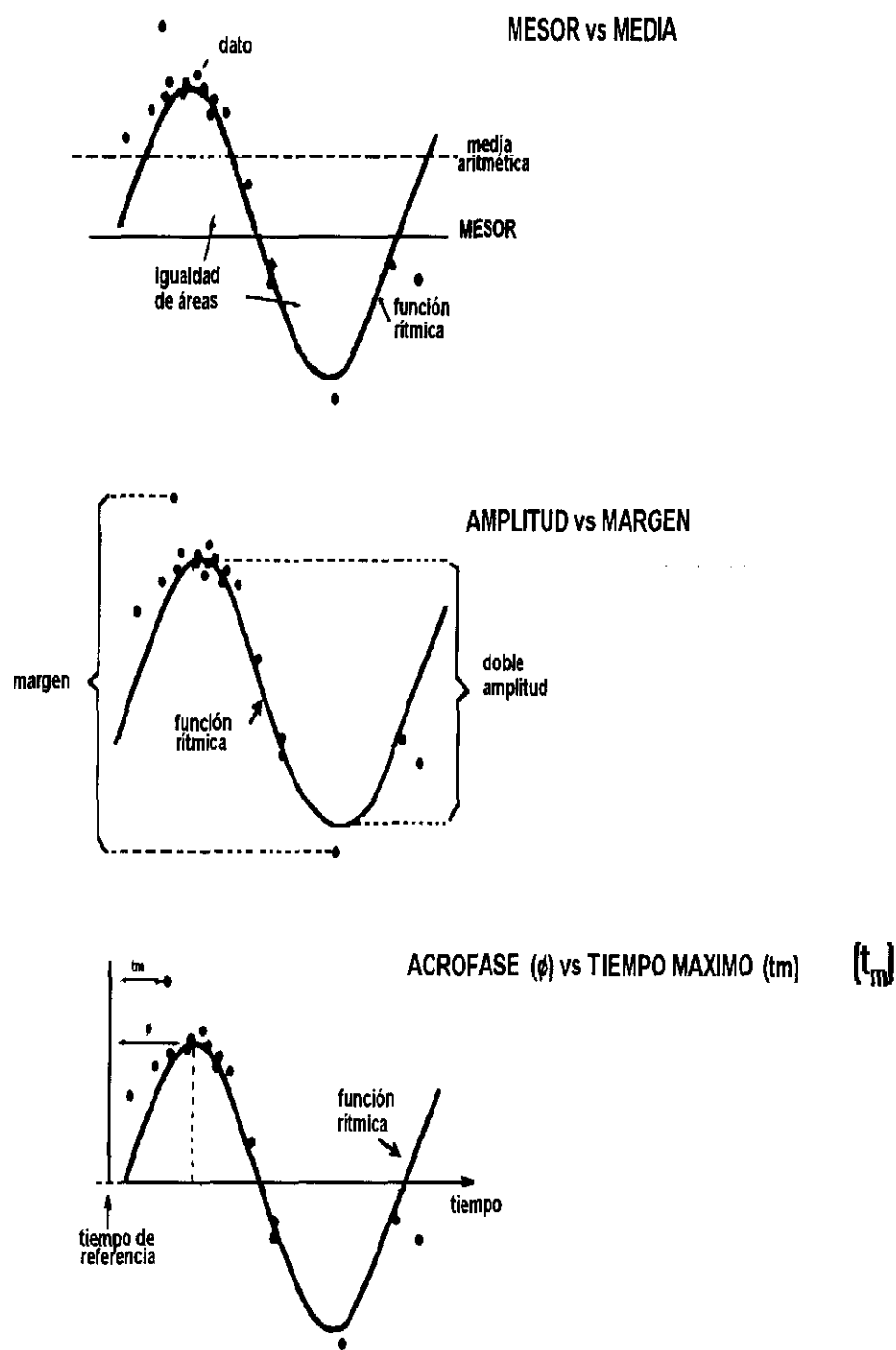


Figura 8

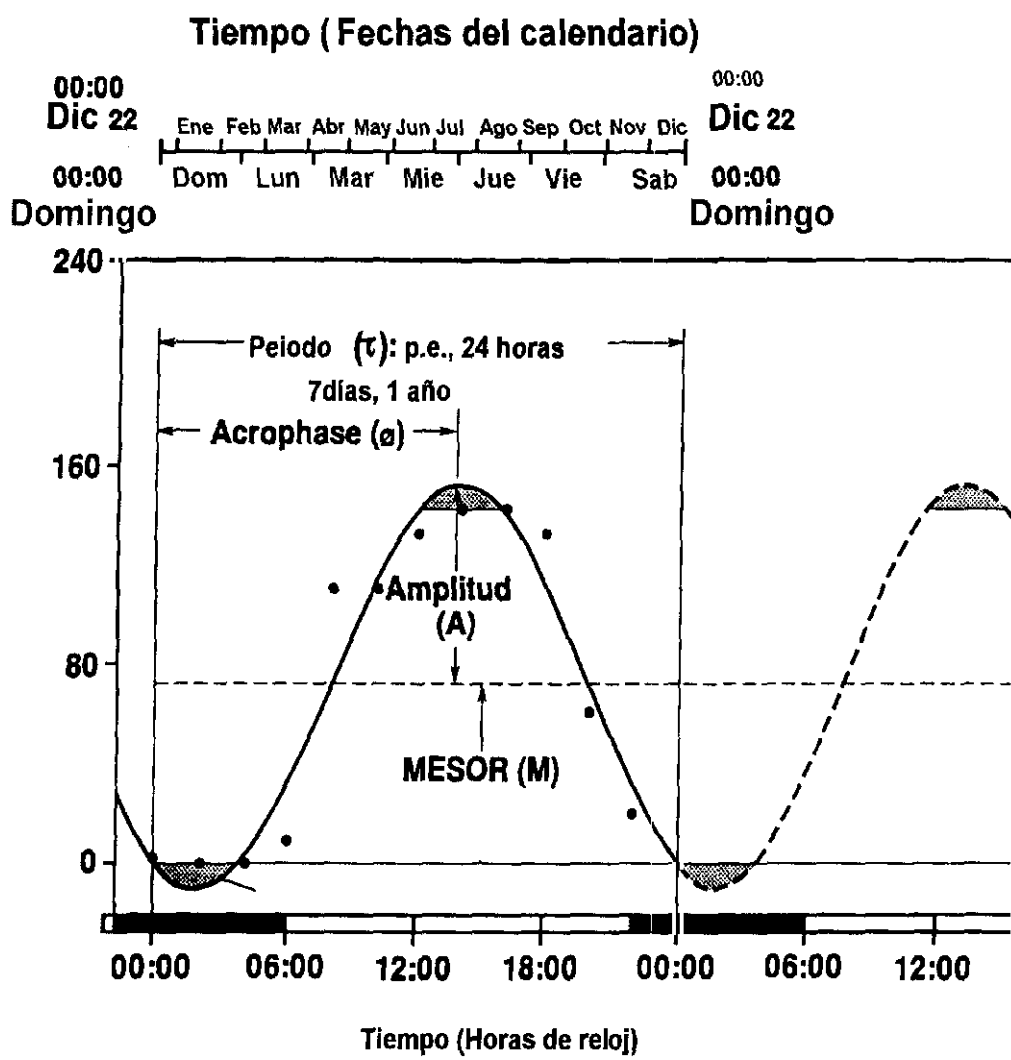


Figura 9

recibe el nombre de **acrofase computativa**. Otro tiempo de referencia puede ser algún punto en el ciclo ambiental sincronizante (ciclo LO), por ejemplo, el punto medio del intervalo de luz (HAML) en el caso de los ritmos circadianos (Halberg *et al.*, 1958; Halberg *et al.*, 1959). Cuando es ésta la referencia seleccionada, la acrofase recibe el nombre de **acrofase externa**. Otra fase de referencia, usada frecuentemente, puede ser un punto de otro ritmo con la misma frecuencia del ritmo que estamos investigando y en el mismo sistema biológico, por ejemplo, la acrofase del ritmo circadiano de los linfocitos circulantes puede ser elegida como fase de referencia y con ésta, la acrofase será **acrofase interna** (figura 10).

La acrofase se puede expresar en grados negativos, igualando 360° a la extensión del periodo, o en unidades de tiempo (minutos, horas, días, meses, etc.), por ello, cuanto más tarde ocurra la acrofase en un ciclo, más negativa será. La acrofase varía en el sentido de las agujas del reloj desde -0° a -360° . Debemos remarcar, que la acrofase es el pico de la curva coseno que más se aproxima a los datos y no tiene que corresponderse con el valor más alto de la serie temporal.

El MESOR y la amplitud se expresan en las unidades en las que se está trabajando. Como los valores de la amplitud representan, por convenio, sólo la mitad de la medida total de la curva coseno, y como éste no alcanza necesariamente el pico de los valores medidos, la amplitud no siempre representa un gran cambio. Frecuentemente es de gran utilidad expresar el cambio relativo predecible en los datos, como porcentaje de cambio (A/M).

Junto con los parámetros estimados del M, A y ϕ , el método cosenor proporciona también intervalos estimados para los parámetros de los ritmos. Asumiendo varias hipótesis y tras deducciones estadísticas, la F estadística que se obtiene puede ser usada para deducir una región de confianza elíptica para la A y la ϕ , en el caso de que los datos se representen de forma polar (figura 11). Esta F estadística también puede usarse para comprobar la hipótesis nula, $H_0: A = 0$. Si se rechaza esta hipótesis, en un determinado nivel de probabilidad α (p.e., 0,05), se puede asumir que las fluctuaciones de los datos no son debidas al azar, sino cíclicas

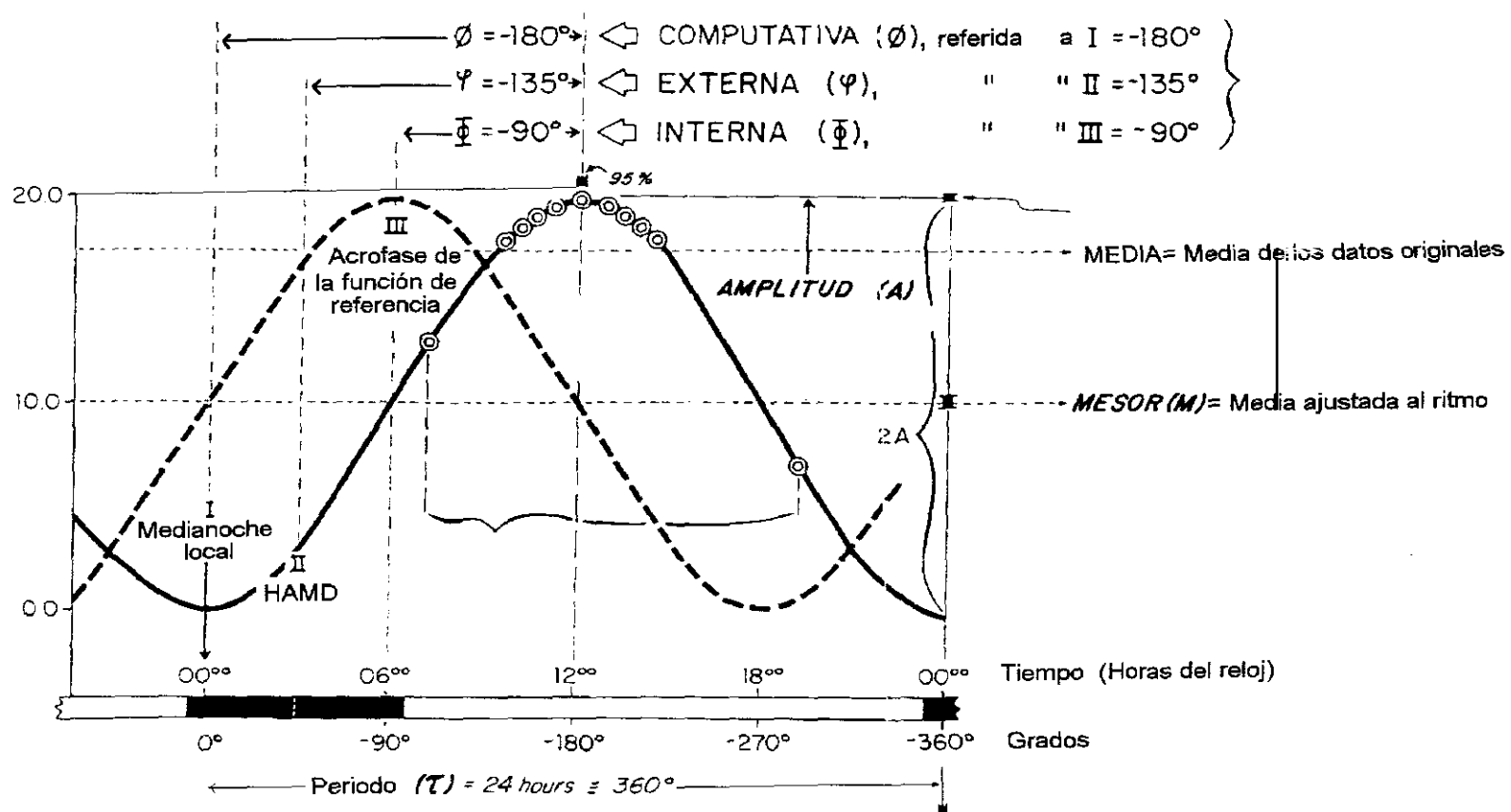


Figura 10

REPRESENTACION POLAR DE LOS PARAMETROS DE LOS RITMOS ESTIMADOS (A, ϕ) JUNTO CON LA REGION DE CONFIANZA

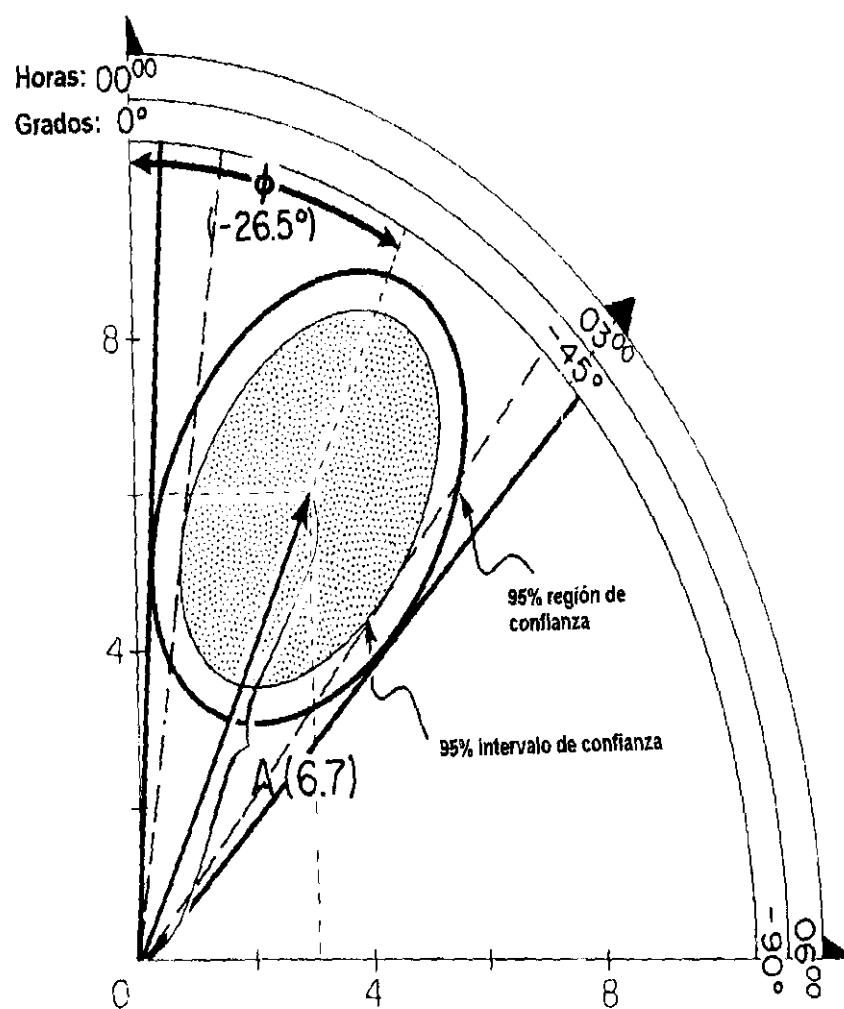


Figura 11

con un periodo τ , proporcionando entonces una validez estadística a las bioperiodicidades. Otra medida de la dominancia de una bioperiodicidad es el porcentaje del ritmo, esto es la proporción de la variabilidad total de los datos en las series de los mismos, que son atribuibles a la curva coseno usada para describir ritmos.

Después de recoger los datos en función del tiempo, el método cosenar (Halberg, 1969) se puede usar ajustando mediante el método de los mínimos cuadrados una función periódica a los datos, de forma que una o varias funciones coseno tengan periodos anticipados a los datos recogidos. En la mayoría de los casos, los periodos se conocen debido a una información biológica anterior, como son los componentes del cronoma, este asume normalmente una periodicidad pareja en frecuencia a la del medioambiente.

Una vez determinados los componentes periódicos se pueden representar, el modelo ajustado se dibuja junto a los datos originales, en función del tiempo, en la **figura de los mínimos cuadrados** (figura 12).

Los componentes del ritmo también se pueden resumir en una **figura polar** (figura 13), donde el par, amplitud y acrofase, está representado como un vector junto a una escala circular de tiempo, la longitud de esta línea indica la amplitud del ritmo y la orientación de la línea, es decir, su dirección con respecto a la escala circular es indicativa de la acrofase del ritmo. Los 360° de la circunferencia representan la extensión del periodo y 0° el tiempo de referencia. Al hacer la analogía entre la esfera del reloj y los ritmos, el 0° está en la parte superior de la figura y la acrofase se expresará en grados negativos, de forma que la acrofase varía en el sentido de las agujas del reloj. El momento de referencia de la fase, alternancia de luz y oscuridad, estaciones del año, acontecimientos especiales, etc., pueden reflejarse en la porción externa de la circunferencia.

En dicha figura también aparece una **región de confianza** del 95% para la combinación de amplitud y de la acrofase, como una **elipse de error** alrededor del extremo del vector. Cuando la elipse no incluye el centro de la circunferencia, indica

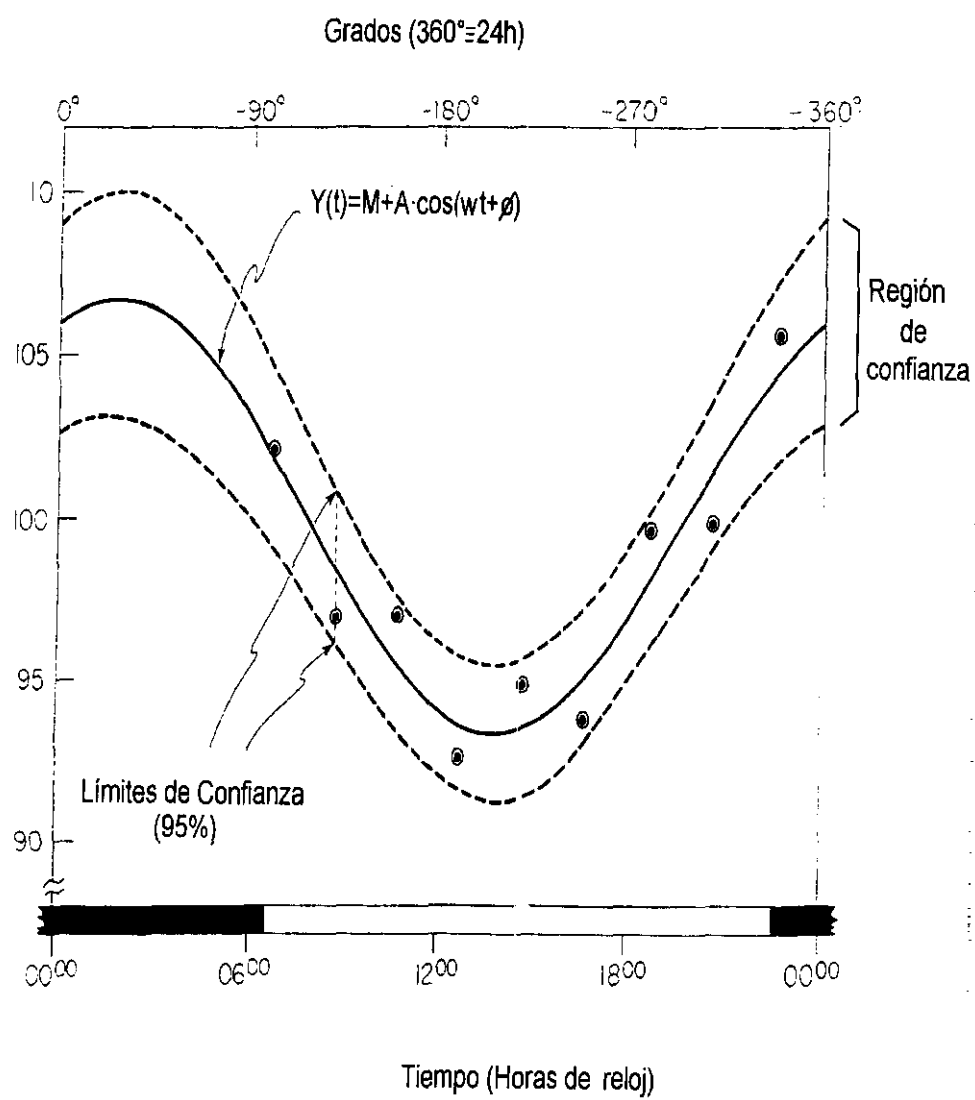
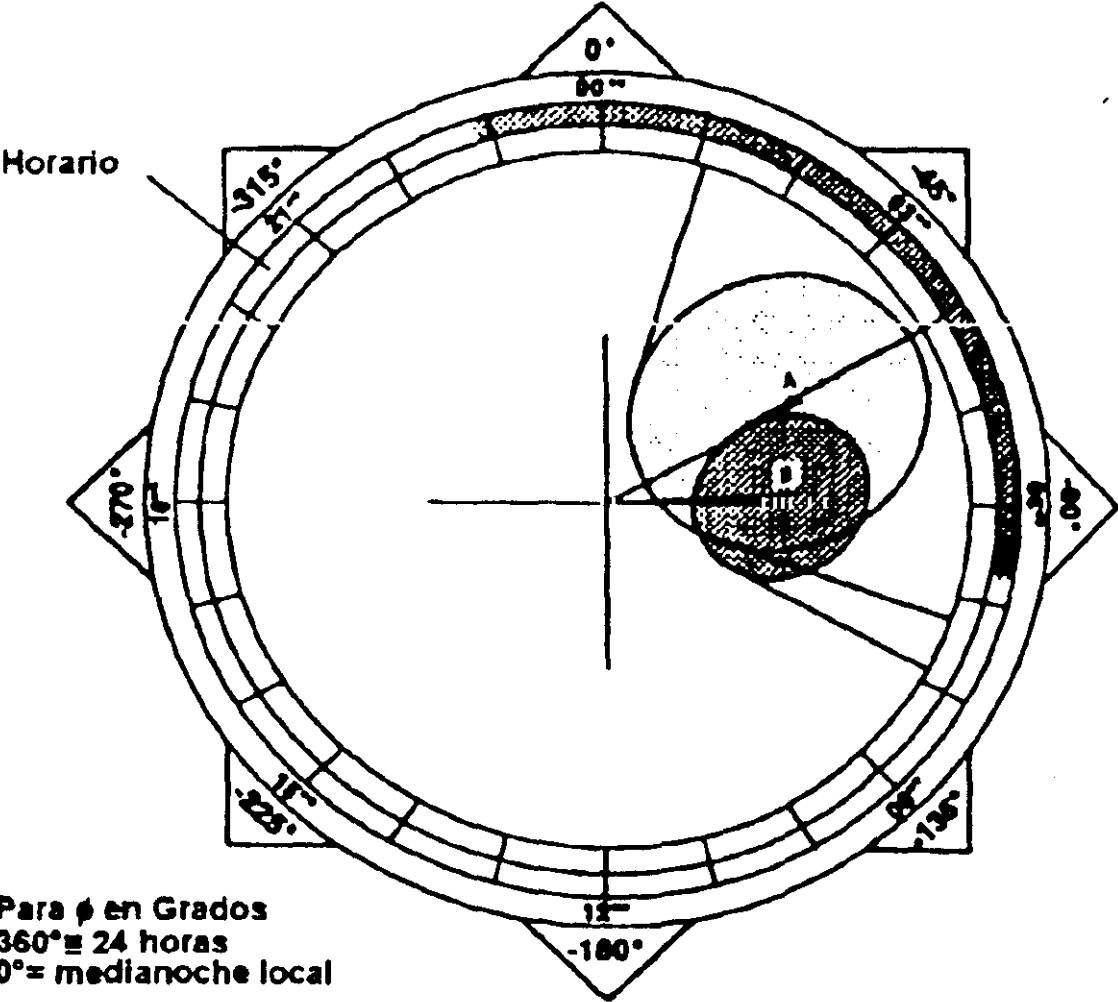


Figura 12



Cieva	P	N	PR	MESOR \pm ES		Amplitud		Acrofase ($^\circ$)
Cáncer	0,067	38	25	104	11	62	(13 81)	-63° (-18 -111)
Sano	<0,001	68	28	100	7	47	(24 71)	-58° (-80 -119)

P=Probabilidad de la hipótesis: Amplitud=0
N=Número de observaciones
PR=Porcentaje del ritmo
* Límites de confianza del 85% (paréntesis) derivados de la elipse coseno

Figura 13

que el ritmo es estadísticamente significativo, o lo que es lo mismo, la amplitud es diferente de cero. Inherente a cualquier función biológica existe un cierto grado de variabilidad y este debe ser aceptado en nuestras determinaciones, con tal de que sus límites puedan ser estimados. Por tanto, de acuerdo con estas estimaciones, la amplitud y acrofase no son valores aislados, sino que cada parámetro debe estar acompañado de una medida de dispersión, llamada **intervalo estimado**. Las ventajas de la representación del coseno se fundamentan en el hecho de que proporcionan, además de una estimación de un punto para la amplitud y la acrofase, intervalos estimados para estos dos parámetros, en forma de **región de confianza** (Haus *et al.*, 1979).

En el caso de estudios longitudinales, desde el momento que se espera que las características de los ritmos sufran cambios espontáneamente, será importante detectar y determinar estos cambios -en función del tiempo- y con este propósito, se desarrollaron las **secciones en serie cronobiológicas** (figura 14) (Halberg *et al.*, 1977). Este método es tanto analítico como gráfico, la parte analítica es básicamente igual a la del coseno simple; primero debemos considerar una sección de los datos con una extensión fija (llamada intervalo), posteriormente este intervalo es desplazado progresivamente, a través de las series de tiempo con un incremento dado. Se va ajustando a cada intervalo de datos un coseno simple con un periodo fijo, obteniéndose los parámetros del ritmo, que aparecen representados en paralelo con los datos originales. Este procedimiento es particularmente útil para mostrar cuando ocurre una desincronización, como en el caso de los ratones ciegos, en los cuales la luz no puede actuar como sincronizador (Bruss *et al.*, 1958); o los estudios en simas o bunkers especialmente preparados, donde algunas personas pasan meses, voluntariamente, sin ningún tiempo de referencia (Aschoff *et al.*, 1971). Si no dispusiésemos de estas secciones en serie, los datos podrían ser representados a lo largo de la escala de las frecuencias, en un espectro de los mínimos cuadrados.

Uno paso importante en la evaluación de los ritmos biológicos es la inspección de los datos originales. El **cronograma** nos proporciona una representación útil de los datos, obviamente la ritmicidad se podrá reconocer fácilmente, si bien ésta es una

SECCION EN SERIE CRONOBIOLOGICA

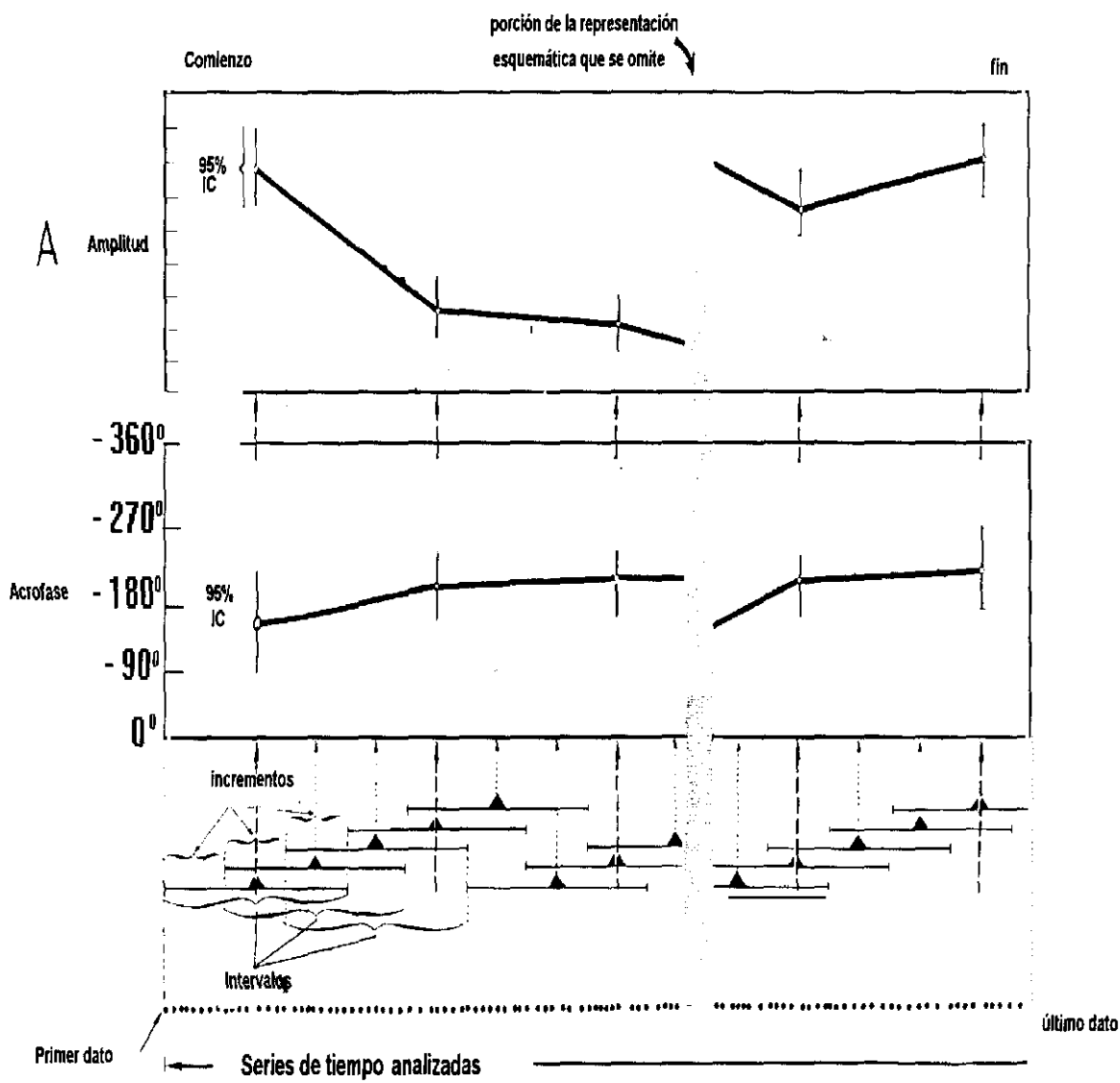
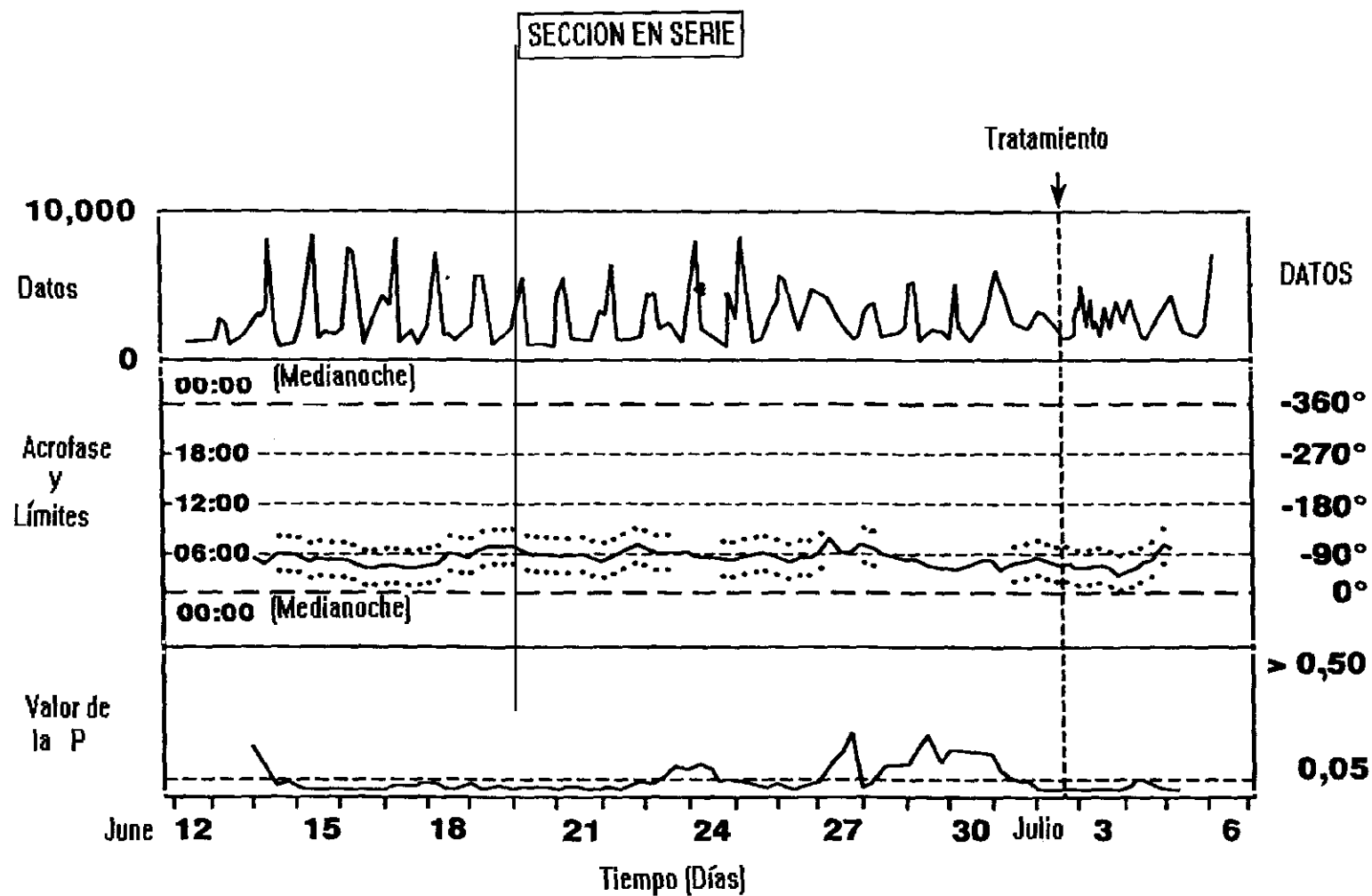


Figura 14

aproximación macroscópica. Para una descripción cuantitativa de los datos sería necesario una aproximación microscópica de estos. El cronograma puede además proporcionarnos una información muy útil concerniente a la necesidad de transformar los datos, la existencia de puntos extremos (incorrectos) o conocer si el modelo es apropiado. El cronograma se puede obtener al realizar una sección en serie de los datos (figura 15).

La suma residual de los cuadrados (RSS) sirve para dos propósitos: para el test de hipótesis (detección del ritmo) y para la estimación de los intervalos de confianza. Los **intervalos de confianza** para el periodo pueden estar determinados mediante el método no lineal de los mínimos cuadrados (Rummel *et al.*, 1974; Bingham *et al.*, 1992). Cuando los límites de confianza del periodo de un determinado ritmo no incluyen el periodo ambiental, se dice que el ritmo presenta **deriva de la acrofase**, cuando ésta reconoce todo el ciclo ambiental, se dice que el ritmo presenta en **curso libre**. Este curso libre ha sido documentado de forma extensiva en ausencia de tiempos de referencia (Halberg *et al.*, 1953; Halberg, 1969; Halberg *et al.*, 1990), tal como sugiere la deriva de la acrofase, y su continuación a lo largo de un ciclo completo, afirma la endogenicidad de un ritmo fisiológico. Cuando el desplazamiento de la acrofase de un ritmo ocurre en un momento dado, y durante un determinado espacio de tiempo, recibe el nombre de **movimiento de la acrofase**. El desplazamiento puede ser gradual o brusco.

En el **plexograma** (figura 16) los datos pueden agruparse en un sólo ciclo, y un número de clases elegidas aplicarse a un análisis de varianza (ANOVA) de una dirección, para determinar los efectos del tiempo. Debemos tener en cuenta que los resultados van a depender del número de clases elegidas y del tiempo de referencia, en el caso de series de datos longitudinales que cubren varios ciclos en pequeños intervalos (Hillman *et al.*, 1990). Se debe señalar también que un efecto del tiempo, estadísticamente significativo, encontrado mediante el empleo del ANOVA, no puede ser interpretado de inmediato como un ritmo. El ANOVA sólo revela que el tiempo puede ser considerado como una fuente de variación estadísticamente significativa.



Periodo = 24 horas | Intervalo = 48 hora | Incremento = 6 horas | Valor de la P para H_0 | $A = 0$

Figura 15

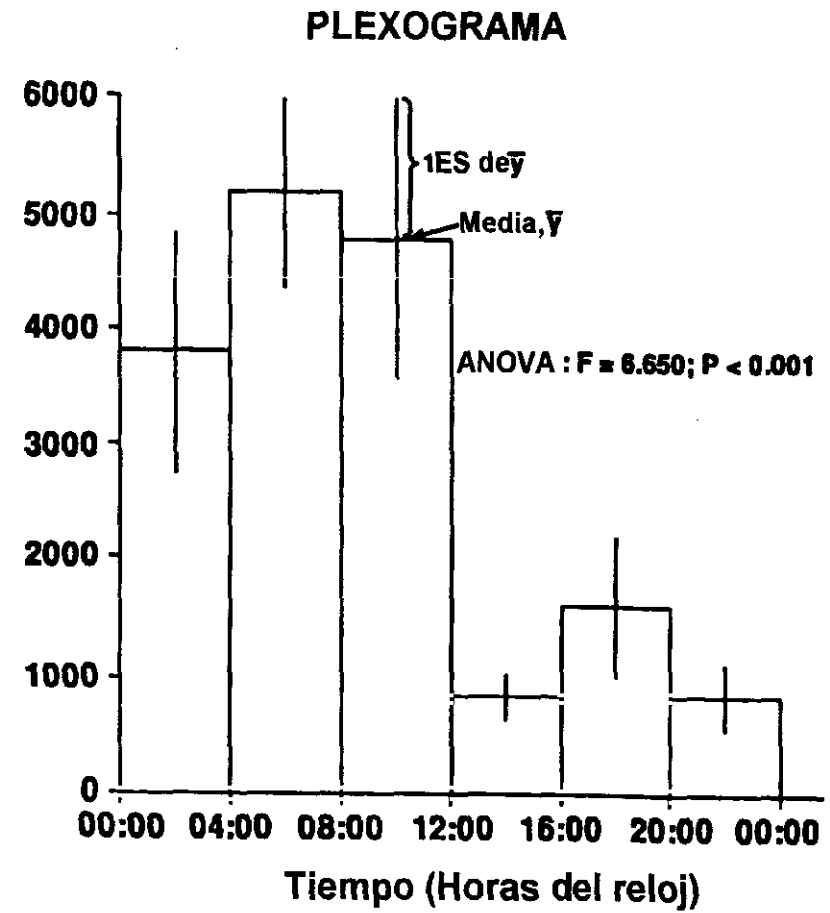
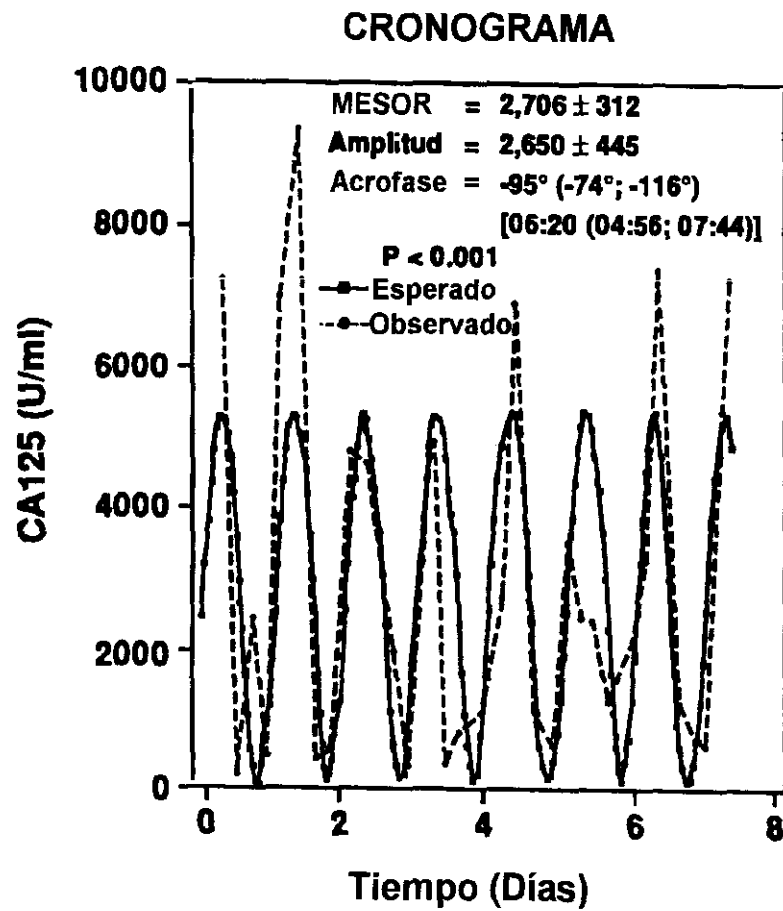


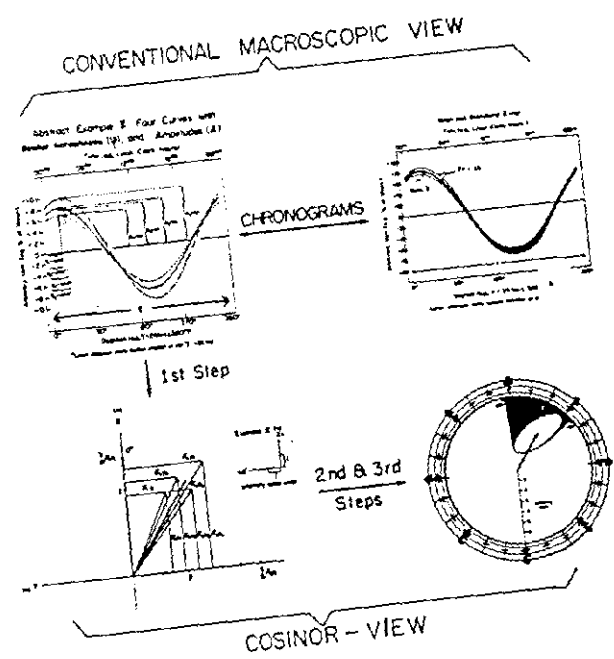
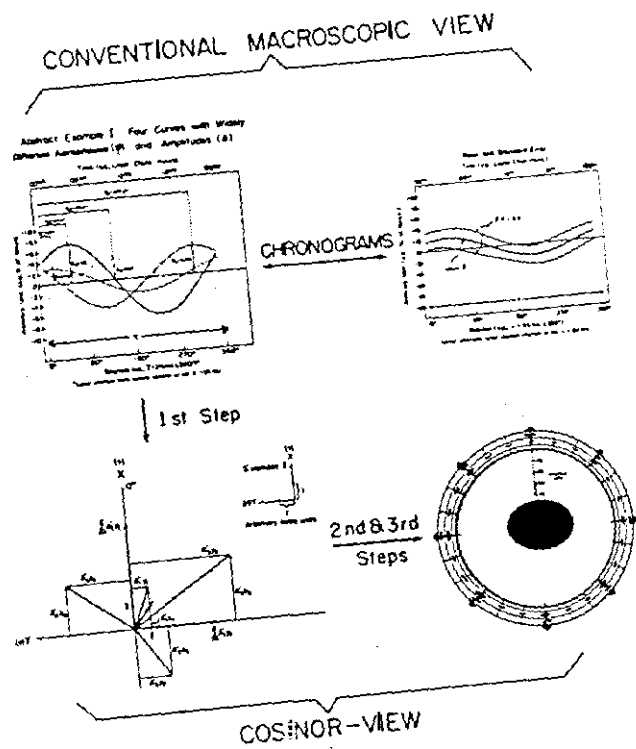
Figura 16

Para resumir los resultados individuales, obtenidos de diferentes animales o individuos que pertenecen a la misma población, las características de los ritmos obtenidas mediante el coseno simple, pueden ser analizadas posteriormente mediante el **coseno de medias de población** (Halberg *et al.*, 1967) (figura 17). Las características del ritmo, obtenidas mediante el coseno simple, son consideradas entonces como datos de entrada. El coseno de medias de poblaciones contribuye en una estadística de segundo orden, que se aplica para deducir **regiones de confianza**, relacionadas con el total de la población. Los parámetros estimados están basados en medias de las estimaciones obtenidas para cada individuo en la muestra. Las regiones de confianza, para estos parámetros de población, van a depender de la variabilidad entre los parámetros individuales estimados. Los test de ritmo y MESOR, son pruebas deducibles estadísticamente de la similitud de los parámetros de los ritmos, en dos o más ritmos.

Cuando se desconoce la duración del periodo de los ritmos, pero se asume que está dentro de un cierto margen, se puede aplicar una **ventana cronobiológica**. Este procedimiento es muy útil también, cuando tratamos con bioperiodicidades que están desincronizadas del periodo del medio ambiente. También se debe aplicar preferentemente cuando los datos cubren un número suficiente de periodos y/o en contra del componente biológico. Este método consiste en aplicar el procedimiento del coseno simple, no únicamente a un periodo prefijado, sino a una serie de periodos de prueba que están dentro de un margen (lineal en periodo), y a disminuciones entre periodos consecutivos ajustados por la ritmometría de los mínimos cuadrados (lineal en frecuencia). En tal caso, estaremos interesados en determinar la extensión del periodo, dentro de este margen, para el cual la suma residual de los cuadrados es mínima.

Otro procedimiento posible, para solucionar el problema de los datos no equidistantes, es el uso del **método no lineal de los mínimos cuadrados** para estimar el periodo, así como la amplitud y la acrofase. Este método también nos permite ajustar al mismo tiempo varias componentes. Para este propósito se usó una combinación de programas de ordenador (Rummel *et al.*, 1974; Marquart, 1963).

Figura 17



Primero se emplean métodos lineales y posteriormente se aplica una ritmometría no lineal con todos los periodos "candidatos" y sus características (obtenidas del método lineal), usados como estimaciones iniciales. Después de una serie de procedimientos, se obtienen los parámetros finales (figura 18).

Desde un punto de vista clínico, la determinación de ritmos con una amplitud relativamente grande se basa en reconocer la necesidad de unos intervalos de referencia especificados en el tiempo. Se necesitan ritmos con distintas frecuencias para caracterizar variables de vital interés especificadas en el tiempo, pero ignoradas habitualmente. Estos ritmos contribuyen, en gran parte, a la gran variabilidad que se observa en los datos clínicos. Desde ahora se podrá mejorar el diagnóstico, si no se recogen los datos únicamente en un determinado momento, sino en intervalos de referencia especificados en el tiempo; los **cronodesmos** (Halberg *et al.*, 1978) colaborarían eficazmente a la interpretación de los datos.

Para la comparación de los parámetros obtenidos mediante el método cosenor, se emplean unos **test de parámetros** diseñados específicamente para ello (Bingham *et al.*, 1982), estos test comparan los MESORes, las amplitudes y/o las acrofases que se obtienen de ajustar la curva coseno, bien a series longitudinales, o a los parámetros de un ritmo circadiano, aplicado a una determinada población; por tanto, la comparación se puede llevar a cabo, tanto de forma individual, como de forma colectiva.

Al recoger los datos en función del tiempo, además de obtener un valor medio más exacto y preciso, también obtendríamos una doble amplitud, que nos mostraría cuál es la variación predecible de estos valores del ritmo, y obtendríamos la acrofase; por ejemplo, si estuviésemos analizando los eosinófilos, en dos grupos de animales, perros y ratas, supuestamente alojados bajo las mismas condiciones ambientales y bajo el mismo ciclo de luz-oscuridad (LO 12:12), encendiéndose la luz a las 08:00 horas y apagándose a las 20:00 h.; nos podríamos encontrar con un valor medio, en un grupo de perros de $0,5 \times 10^9/l$ y el valor medio de un grupo de ratas de $0,4 \times 10^9/l$, lo único que podríamos decir es que presentan unas concentraciones similares de eosinófilos;

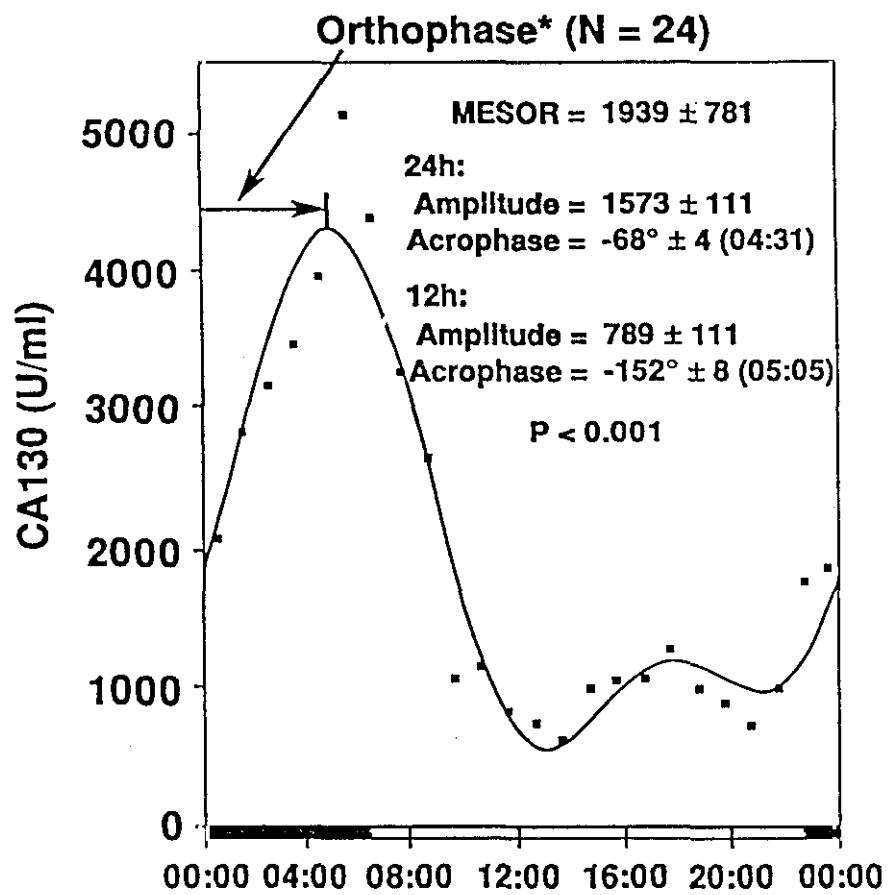


Figura 18

en cambio, si empleásemos el método cosenior, obtendríamos el MESOR, que para el primer grupo sería, p.e., igual a $0,44 \times 10^9/l$ y para el segundo $0,47 \times 10^9/l$; pero también obtendríamos la acrofase, dato fundamental en lo referente al ritmo de los eosinófilos, puesto que la acrofase en los perros tendría un valor de -30° , lo que significa que los valores máximos se alcanzan durante el periodo de oscuridad y en el grupo de ratas obtendríamos una acrofase de -210° , lo que indica que los valores máximos se alcanzan durante el periodo de luz, aparte de obtener la doble amplitud. Mientras que con los métodos empleados hasta ahora, sólo podríamos decir que los valores de eosinófilos en rata y perro son similares, únicamente con estos tres parámetros nos damos cuenta que sus ritmos están en alofase (son opuestos). También obtendremos nuevos parámetros, que pueden ser evaluados por sí mismos, como guías del efecto de un tratamiento o de la prognosis de una enfermedad.

El empleo del método cosenior y la obtención de estos nuevos parámetros -MESOR, amplitud y acrofase, que definen los ritmos circadianos, circaseptanos, etc, de forma más exacta, en el **diseño experimental** de una investigación— nos proporcionará resultados cronofisiológicos más precisos.

MATERIAL Y METODOS

Al ser ésta, una Tesis dirigida por un Veterinario y un Médico, en ella vamos a encontrar, en cuanto a sujetos empleados para el posible desarrollo de la misma, personas y animales, puesto que la cronobiología es una ciencia aplicable en ambos campos y de la cual se pueden beneficiar, tanto unos como otros.

OBTENCION Y ANALISIS DE LAS MUESTRAS

EXPERIMENTO 1: Variación Circadiana del Cortisol

Animales:

En este estudio se emplearon un total de 150 conejos machos adultos, Blancos de Nueva Zelanda (NZW), cruzados entre sí a lo largo de más de 20 generaciones, mantenidos en un ambiente microbiano convencional y con un peso de aproximadamente $2,90 \pm 0,15$ kg. Los animales se dividieron en dos grupos, según el método de recogida de muestras a seguir: serialmente dependientes (25 animales) y serialmente independientes (125 animales), estos dos grupos se subdividieron a su vez en cinco subgrupos según el ciclo de luz empleado.

Alojamiento y alimentación:

* jaulas de malla metálica individuales de 48 x 61 x 46 cm

* condiciones ambientales estándar:

- temperatura ambiental: 18° - 24°C
- humedad relativa del aire: 50-55%
- renovación del aire: 10 a 15 ciclos por hora

La dieta consistió en 150 g/día de Purina Laboratory Rabbit Chow

- 16,2% de proteína
- 2,5% de grasa
- 13,5% de fibra

y con disponibilidad de agua *ad libitum*.

Los animales fueron alojados bajo 5 ciclos diferentes de luz, con unas duraciones de los periodos de luz-oscuridad (LO) de:

- LO 16:08
- LO 14:10
- LO 12:12
- LO 10:14
- LO 08:16

En las cuales el primer número se corresponde con la duración de la luz (fotofracción) y el segundo con la duración del periodo de oscuridad (escotofracción), en un régimen de luz cíclico de 24 horas. En todos los ciclos la luz se encendió a las 08:00 am.

El periodo de adaptación para cada una de estas condiciones fue de 20 días.

Toma de muestras:

Material

- Agujas de 0,8 x 25 mm (21 G x 1") (Becton Dickinson).
- Tubos vacutainer heparinizados de 100 x 16 mm (Becton Dickinson).
- Xileno (Panreac).
- Algodón.

Metodología empleada para la toma de muestras

En la obtención de muestras, para determinar el ritmo circadiano del cortisol en los conejos se empleó un estudio transversal y dos métodos diferentes. Una de las técnicas consistió en la obtención de datos en los mismos animales, o recogida de muestras de forma serialmente dependiente. En este procedimiento, cada conejo proporciona 5 muestras de sangre a intervalos de 4 horas, durante un ciclo de 24 horas (se omitió una de las tomas de muestra).

La otra técnica consistió en la obtención de muestras de forma serialmente independiente, cada valor de cortisol se obtuvo de un conejo diferente, es decir cada conejo únicamente proporciona una muestra de sangre. Por tanto, en cada momento de la obtención de muestras y para cada ciclo de luz, en un método serialmente independiente, se obtienen 5 valores de cortisol, cada uno proviene de un conejo diferente; necesitando 25 conejos por cada ciclo de luz. Como empleamos cinco ciclos de luz diferentes para estudiar el efecto que éstos tienen en el cortisol, necesitaremos utilizar un total de 125 animales.

Las muestras sanguíneas se recogieron a las 08:00, 12:00, 16:00, 20:00 y a las 00:00 horas, de la vena marginal de la oreja. Después de la extracción de sangre, el plasma fue separado en una centrífuga Minifuge RF (Heraeus) a 1200 x g y a 4°C, durante 20 min. El plasma obtenido se extrajo mediante el uso de una pipeta pasteur (Brand) y se introdujo en tubos de plástico de 50 x 15 mm, tapándolos con parafilm (American Can Company). Se identificó cada tubo mediante una etiqueta en la que se anotó el número de animal, la hora y la fecha de recogida, así como el número de alícuota. El plasma se conservó congelado a -30°C, hasta el momento del análisis hormonal.

Determinación de las concentraciones hormonales

El procedimiento para determinar las concentraciones plasmáticas de cortisol fue el ELISA de competición, según el protocolo descrito por Silván (1991),

empleando como fase sólida una microplaca de poliestireno de Dynatech (Germany) de 96 pocillos.

Los derivados esteroides para los conjugados (4-Pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3,20 dione 3-CMO) y la hormona estándar (4-Pregnen-11 β ,17 α ,21-triol-3,20 dione) se adquirieron en Steraloids Inc. (Wilton, New Hampshire, USA).

Los anticuerpos y conjugados fueron los producidos y caracterizados en el Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria, UCM; la HRP RZ=3,2 (peroxidasa de rábano picante) se obtuvo de Boehringer Mannheim y la OPD (O-phenylenediamine dihydrochloride) de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA).

La determinación del cortisol se realizó en el plasma sin extraer. La sensibilidad del ensayo es de 0,1 pg/pocillo y el coeficiente de variación (CV) intra- e inter-ensayo fue menor del 5%, en todos los casos. Las dosis y las curvas estándar de la hormona se obtuvieron usando un programa especial de ELISA (Informatics Department, University of California, Davis, California, USA).

EXPERIMENTO 2: Marcadores de Crecimiento, CA125 y CA130

Sujetos

En este estudio la recogida de muestras salivares se realizó tanto en personas como en animales.

En lo concerniente al grupo de personas, éste estaba constituido por un total de 32 mujeres y por un hombre.

El grupo de mujeres estaba subdividido en tres grupos:

- el primero se corresponde con un grupo de personas sanas con edades

comprendidas entre los 28 y los 48 años.

- el segundo grupo estaba constituido por un total de 5 mujeres con tumores, casi todas ellas presentaban cáncer de ovario, sus edades estaban comprendidas entre los 35 y los 72 años.
- el tercero y último lo constituían un grupo de mujeres con ovarios poliquísticos, cuyas edades oscilaban entre los 38 y los 45 años.

El hombre que participó en el estudio era un hombre clínicamente sano de 72 años de edad.

Los animales empleados en el estudio de los marcadores de crecimiento, CA125 y CA130, fueron:

* vacas:

- Raza Frisona
- Edad: 2-4 años
- Alojamiento: explotación de producción lechera
- Alimentación: dieta equilibrada compuesta por:
 - soja 44 20,0%
 - maíz 20,0%
 - cebada 55,5%
 - grasa by-pass 1,5%
 - corrector 3,0% (carbonato, fosfato y oligoelementos)
- Agua: *ad libitum*

* conejos

- Raza: Blancos de Nueva Zelanda (NZW)
- Edad: 6 meses
- Peso: 3 - 3,5 kg
- Alojamiento: jaulas individuales de 48 x 61 x 46 cm

- Alimentación: 150 g/día de alimento para conejos (Purina)
 - proteína 16,2%
 - grasa 2,5%
 - fibra 13,5%
- Agua: *ad libitum*
- Condiciones ambientales: 21-24°C
 - 45-55% de humedad
 - LO 14:10, encendiéndose la luz a las 07:00 horas

* ratas

- Estirpe: Wistar
- Edad: adultas
- Peso: 250-300 g
- Alimentación en forma de pellets (Purina Lab Chow) *ad libitum*
- Agua: *ad libitum*

* ratones

- Estirpe: Balb/c
- Edad: adultos
- Peso: 22-25 g
- Alimentación: igual que la anterior
- Agua: *ad libitum*

Toma de muestras

Material

- Tubos de plástico 50 x 10 mm.
- Embudo de plástico.
- Cánulas para la obtención de saliva (Andersen).
- Vaso medidor para determinar la cantidad de agua del enjuague de la boca.

Metodología empleada en la toma de muestras

La saliva de las personas se recogió a lo largo del día, a intervalos de aproximadamente 4 horas durante las 24 horas y en algunos casos con ocasionales interrupciones durante la noche. Las muestras se recogían al menos una hora después de cualquier ingestión de comida o líquidos. La obtención de esta saliva se hizo antes y después de un completo enjuagado de la boca. En cada caso se recogió aproximadamente 1 ml de saliva en tubos de plástico de 50 x 10 mm (a veces mediante la ayuda de un embudo) y se congeló inmediatamente a -25°C. El periodo de recogida varía según la persona, éste se detalla posteriormente en la tabla 6.

El diseño del estudio en este caso es de tipo mixto o híbrido, pues se determina en varias personas (transverso) y durante varios días en cada persona (longitudinal). El horario seguido fue similar en todas ellas, levantándose entre las 07:00 y 08:00 h de la mañana y acostándose entre las 00:00 y la 01:00 h de la noche.

La saliva de los animales se recogió mediante canulación de la glándula parótida y siempre una hora después de cualquier ingestión de comida o líquido. Se recogieron aproximadamente 0,5 ml de saliva en pequeños animales y de 1-2 ml en vacas. Todas las recogidas se realizaron sin enjuagar la boca. La saliva se congeló a -25°C hasta su posterior análisis.

Las extracciones sanguíneas de las vacas se realizaron de la vena caudal del rabo; de los conejos de la vena marginal de la oreja, y de las ratas y de los ratones de la vena central de la cola. La sangre se centrifugó y almacenó, hasta su posterior análisis, siguiendo los pasos descritos anteriormente para los conejos. Las muestras se recogieron a las 08:00 de la mañana en todos los animales.

Determinación de las concentraciones de los marcadores de crecimiento

Trabajamos con dos marcadores de crecimiento, CA125 (Cancer Antigen 125) y CA130 (Cancer Antigen 130), inicialmente llamados marcadores tumorales, puesto que al principio únicamente se utilizaban para determinar tumores ováricos de origen no mucilaginoso (Bast *et al.*, 1981).

Marcador de crecimiento CA125

Fue determinado en saliva y suero, mediante radioinmunoanálisis (RIA), con kits procedentes de Centocor (Malvern, Pennsylvania, USA), un test *in vitro* para una valoración cuantitativa del determinante antigénico CA125. Las determinaciones químicas fueron llevadas a cabo según los métodos descritos originalmente por Bast *et al.* (1981) y Chen *et al.* (1990), estos autores produjeron un anticuerpo monoclonal, llamado OC125, el cual reconoce al determinante antigénico CA125, con una sensibilidad del 88% en la detección de carcinomas ováricos epiteliales no mucilaginosos y de un 60% en cáncer de útero, necesitándose únicamente 50 μ l de volumen por muestra.

Marcador de crecimiento CA130

Las determinaciones del CA130 se realizaron mediante radioinmunoanálisis con kits D-7111, procedentes de Daiichi Radioisotope Laboratories (Tokyo, Japan). Se utilizó un análisis inmunoradiométrico tipo "sandwich" (double-determinant assay) con anticuerpos monoclonales 130-22 y 145-9 (Kobayashi *et al.*, 1991), obtenidos de ratón. El ensayo muestra una excelente sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, cubriendo la curva estándar un margen de 10 a 500 U/ml.

Las muestras de los animales descritos fueron empleadas, tanto para comprobar la existencia de marcadores de crecimiento, como para determinar, en caso de encontrar estos marcadores, cuál era su concentración a nivel sanguíneo y salivar, así como su relación con los niveles encontrados en la especie humana y su posible

utilización en investigación animal.

EXPERIMENTO 3: Presión Sanguínea y Frecuencia Cardiaca

Sujeto

El estudio se realizó en una mujer clínicamente sana de 28 años, en la que se controló y midió la presión sanguínea (PS) y la frecuencia cardiaca (FC). Iniciando el día, aproximadamente, a las 07:00 h y acostándose, aproximadamente, a las 00:00 horas.

Metodología

Material

- Monitor portátil automático ABPM-630 (Colin Medical Instruments Ltd., Komaki City, Japan).
- Casete de memoria.
- Cartucho de CO₂.
- Procesador de datos (Colin Medical Instruments Ltd., Komaki City, Japan).
- Ordenador portátil IBM con una impresora Laserjet III.

Método empleado en la recogida de datos

La recogida de datos se llevó a cabo de forma longitudinal, desde el 17 de abril al 28 de julio de 1992, con un monitor portátil automático.

Este monitor es fácilmente transportable y está constituido por dos partes, la unidad principal y un manguito, conectados mediante un tubo de plástico, por donde circulará el CO₂, y un cable que lleva la información desde los sensores del manguito a la memoria del monitor; el manguito se sitúa con los sensores en la cara interna del

brazo izquierdo, inmediatamente antes del codo. En la unidad del monitor se encuentran alojados, aparte del programa diseñado especialmente para el control de PS y FC, una memoria donde quedarán almacenados los datos; con una capacidad de almacenaje de aproximadamente 4-5 días (40.000 bytes), dependiendo de la frecuencia con que éstos se recojan, esta memoria es extraíble para poder conectarse posteriormente a un procesador de datos, conectado a un ordenador.

La unidad también tiene capacidad para alojar una batería recargable y un cartucho de CO₂ con el que se inflará el manguito; éste es de plástico y está cubierto por una funda de tela que aloja en su interior dos sensores de presión, para determinar con una mayor precisión la PS y FC, bien de forma oscilométrica (por sensores que detectan las ondas de la presión sanguínea) y/o por sonidos de Korotkoff. Apareciendo los datos medidos en una pantalla de cristal líquido.

El monitor que va colocado en la cintura puede ser programado para obtener datos, cada 15, 30 ó 60 minutos, de la presión arterial sistólica (PAS), la arterial media (PAM) y la presión arterial diastólica (PAD), así como mediciones de la FC. Aunque en este caso, como hemos citado con anterioridad, las mediciones se realizaron cada 15 minutos, durante las 24 horas del día, con ocasionales interrupciones.

Al conectar la memoria al procesador de datos y éste al ordenador, obtendremos las series de datos en el tiempo, parte fundamental en cronobiología. Los datos de la PAS, PAM y la PAD vienen expresados en mm de Hg y la frecuencia cardiaca en ppm (pulsaciones por minuto).

METODOLOGIA ANALITICA CRONOBIOLOGICA

Después de la obtención de las series de datos, tanto de la presión sanguínea, frecuencia cardiaca y marcadores de crecimiento, como las series de datos del cortisol, todas ellas fueron analizadas de forma cronobiológica mediante, un ordenador

compatible IBM, y con la ayuda de programas desarrollados en los Chronobiology Laboratories, University of Minnesota, Minneapolis (MN, USA) y cedidos amablemente por el Dr. Franz Halberg, director de dicho laboratorio.

Experimento 1: Variaciones circadianas del cortisol

Los datos del cortisol obtenidos fueron analizados por el método cosenar simple (Halberg, 1969). En este caso el procedimiento consistió en ajustar, mediante el método de los mínimos cuadrados, una curva coseno de 24 horas (circadiana) y también, una de 12 horas (circasemidiana), por separado y una combinación de ambas curvas coseno, a los datos.

Por cada componente considerado en el modelo (24 horas y 12 horas), se obtienen una amplitud y una acrofase, éstas son medidas de la magnitud y el tiempo del cambio que se produce y que son predecibles en un ciclo del ritmo, por tanto obtendremos 3 amplitudes y tres acrofases (una para 24 h, otra para 12 h y la última para el modelo de dos componentes). Además, se estima el MESOR, media ajustada al ritmo, siendo éste similar para los tres modelos.

Se eligió como fase de referencia, para todos los métodos, el HAML (punto medio del intervalo de luz), después de realizar diferentes cálculos previos y teniendo en cuenta trabajos anteriores, en los que se tratan las ventajas de la utilización de las distintas etapas de los ciclos de luz-oscuridad, como tiempos de referencia (Sothorn y Halberg, 1979; Sothorn *et al.*, 1978).

Para simplificar los resultados obtenidos de cada conejo, en el muestreo serialmente dependiente se usó el método cosenar de medias de poblaciones (Halberg *et al.*, 1967). Los datos obtenidos de cada cinco conejos, en el sangrado serialmente independiente, se analizaron mediante el método cosenar simple, para poder generalizar las deducciones hechas, a la población.

Dos aspectos de este estudio fueron particularmente interesantes: uno relacionado con la comparación del ritmo circadiano del cortisol de los conejos, determinado en dos esquemas de sangrado diferentes (serialmente dependiente y serialmente independiente), y el otro consiste en una comparación del perfil circadiano del cortisol, entre diferentes ciclos de luz, en ambos grupos de sangrado.

Para poder proceder con estas comparaciones se emplearon los test de comparación de parámetros, creados a medida para ello (Bingham *et al.*, 1982); mediante estos test se comparan los MESORes, amplitudes y/o acrofases, primero de forma separada (es decir MESOR con MESOR) y posteriormente de forma conjunta (considerando al mismo tiempo MESOR, acrofase y amplitud). Utilizando los parámetros que se obtuvieron de ajustar una curva coseno a las series simples de cada conejo o bien, aplicándolo a los parámetros del ritmo circadiano de la población de conejos, por tanto la comparación se puede llevar a cabo tanto de forma individual, como de forma colectiva, comparando cada parámetro de forma separada o bien de forma conjunta.

En el estudio del muestreo serialmente independiente, de cada conejo se obtuvo una sola muestra, y las series de tiempo se construyeron considerando de forma concomitante los 25 datos de los 25 conejos en un determinado régimen; es decir, de entre los 25 valores que provenían del sangrado de los 25 animales, no existió preferencia al seleccionar 5 series de 5 valores, que se correspondiesen con las 5 series obtenidas de los 5 conejos sangrados de forma serialmente dependiente, sino que fue una selección al azar. Por supuesto existía la posibilidad de considerar todas las ordenaciones posibles, mediante combinaciones y permutaciones, para constituir series de 5 valores para analizar, pero este procedimiento no fue empleado en este caso.

Experimento 2: Marcadores de crecimiento, CA125 y CA130.

Las series de datos se analizaron con métodos ritmométricos, principalmente mediante el método cosenar simple, descrito anteriormente, con un periodo, τ , anticipado de 24 ó de 168 horas.

Primero fue necesaria la detección de la existencia de un ritmo circadiano en los marcadores de crecimiento de las personas sanas y de varias de las personas con cáncer, cuando no se pudo detectar el ritmo circadiano, se abrió una ventana cronobiológica, lineal en frecuencia, para detectar la existencia de otras bioperiodicidades, también se ajustó una curva coseno circaseptana (168 h ó 7 días) a los datos.

Para las diferentes características se obtuvieron los puntos e intervalos estimados, estos parámetros fueron el MESOR (M), la medialínea del ritmo de los marcadores de crecimiento estimada estadísticamente; la doble amplitud circadiana (2A), o la medida de la extensión del cambio de las concentraciones de CA125 y CA130, que se produce en un día y que es predecible; y la acrofase (ϕ), una medida del momento en que se produce el conjunto de los valores más altos de CA125 y de CA130 y que recurren en cada ciclo.

La acrofase estará expresada en grados negativos, relacionando los 360° con τ , si $\tau = 24$ horas la acrofase se podrá expresar también en horas, y si $\tau = 168$ h se podrá expresar en días de la semana. El tiempo de referencia elegido para el estudio de estos ritmos fue la medianoche local.

Se utilizaron métodos convencionales de estadística que consisten en el cálculo de medias, error estándar y de un análisis de varianza (ANOVA) (Sokal y Rohlf, 1981). En vista de la distribución del CA125 y del CA130, algunos de los análisis se realizaron también, después de una transformación logarítmica, en base 10, de los datos. Los análisis, por tanto, se llevaron a cabo tanto en los datos originales como en los transformados en logaritmos para facilitar la interpretación de los mismos. El

primer análisis (datos originales) sirve para visualizar la localización y la dispersión de los datos originales y el segundo (\log_{10} de los datos) para aproximar de forma más exacta lo asumido en los tests clásicos.

Los datos se agruparon en unos periodos ideales, circadiano y circaseptano, y se analizaron mediante un análisis de varianza, para determinar el efecto del tiempo en los mismos, obteniendo al mismo tiempo plexogramas o representaciones gráficas de los datos agrupados en clases.

Experimento 3: Alofase circatrigintana entre PS y FC

En esta ocasión, al igual que en las anteriores, los métodos empleados están basados en el coseno, empleando el método cosenior simple. Primeramente se ajustó una curva coseno con $\tau = 24$ horas, a los 8.583 datos, determinando la ya conocida ritmicidad circadiana de la presión sanguínea y de la frecuencia cardiaca, por tanto este ajuste de la curva se realizó por cuatriplicado, es decir una vez para la PAS, otra vez para PAM, posteriormente para la PAD y por último para la FC. Por tanto el volumen de datos empleados fue de 34.332 datos. Como día de referencia para esta determinación se tomó el primer día del ciclo menstrual, pues es el sincronizador de muchos de los ritmos en las mujeres, como son el circaseptano y el circatrigintano.

Tras la detección el ritmo circadiano se procedió a realizar secciones en serie de los datos de la presión sanguínea (PAS, PAM, PAD) y de la frecuencia cardiaca, tomando como periodo, intervalo e incremento 24 horas, en todos los casos obtenido un MESOR, una amplitud y una acrofase para cada día. Estas características de los ritmos serán consideradas, posteriormente, como datos de entrada para la realización de otros análisis cronobiológicos.

Para la obtención del gráfico mediante el método lineal de los mínimos cuadrados, se ajustó la curva coseno de 720 horas (30 días) a los 92 MESORes diarios, obtenidos de ajustar la curva coseno circadiana en la sección en serie.

La figura polar circadiana se obtuvo mediante la aplicación del cosenar simple a los 92 MESORes, amplitudes, acrofases, P.R. y valores de p , obtenidos de la sección en serie, mientras que para la circatrigintana se emplearon los datos originales de una semana.

RESULTADOS

A continuación vamos a pasar a detallar los resultados obtenidos a lo largo de esta experimentación; primero expondremos los resultados del análisis de las muestras de cortisol plasmático, en dos grupos de conejos, sangrados mediante dos métodos diferentes: serialmente dependiente y serialmente independiente.

A continuación detallaremos los resultados obtenidos al analizar el cronoma de dos marcadores de crecimiento, el CA125 y el CA130, tanto en sujetos sanos como enfermos con tumores ováricos.

Finalmente, expondremos los resultados obtenidos al analizar las largas series longitudinales de la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea.

EXPERIMENTO 1: VARIACIONES CIRCADIANAS DEL CORTISOL

En la tabla 1 están detalladas las características del ritmo circadiano (MESOR, amplitud y acrofase) del cortisol plasmático en conejos mantenidos bajo 5 ciclos de luz diferentes, y que fueron sangrados siguiendo dos metodologías distintas: serialmente dependiente y serialmente independiente. Cada característica del ritmo está expresada con sus límites de confianza del 95% (ES: para el MESOR y la amplitud e IC: para la acrofase). La amplitud está referida en sus unidades originales y en porcentaje del MESOR; este último empleado para eliminar el efecto de la variabilidad inter-individual.

La tabla 2 resume dos de los parámetros (A y acrofase) de los componentes del ritmo ($\tau = 12$ horas y $\tau = 24$ horas) del cortisol plasmático y cómo contribuyen (p y PR) estos dos componentes a la forma de la curva, así como la probabilidad y el porcentaje del ritmo, cuando consideramos el modelo de la curva coseno constituido por esos dos componentes (Total). Estas características del ritmo se describen de forma independiente para cada ciclo de luz primero y, posteriormente, los datos son considerados como una población, es decir, se analizan los datos como si todos los conejos perteneciesen al mismo colectivo, sin considerar los distintos ciclos de luz.

En la tabla 3 están recogidos los parámetros del ritmo, y se indican las diferencias que se observan en el ritmo circadiano del cortisol plasmático de mujeres sanas a lo largo del año.

El esquema 1 relaciona las horas de reloj con las horas HAML (Hours After Mid Light: horas después de la mitad del intervalo de luz) en los cinco ciclos de luz-oscuridad.

En las gráficas 1 a 5 están representadas las diferentes concentraciones del cortisol plasmático, a lo largo del día, en conejos sangrados de forma serialmente independiente y serialmente dependiente. Cada punto del gráfico se correspondería

con la media de una serie de cinco conejos, y cada gráfico se corresponde con cada uno de los 5 ciclos de luz empleados (LO 16:08, 14:10, 12:12, 10:14, 08:16). En el eje de ordenadas está representado el tiempo (HAML), y en el de abcisas las concentraciones de cortisol (ng/ml).

En la gráfica 6 están representados los niveles de cortisol plasmático en el conjunto de conejos sangrados serialmente dependiente, y en la gráfica 7 el conjunto de los sangrados de forma serialmente independiente (obsérvese la diferencia de concentraciones).

La gráfica 8 representa la relación existente entre la duración de las horas luz y la amplitud, determinada en cada conejo.

Las gráfica 9 y 10 son representaciones polares de los valores del cortisol. La gráfica 9 de los conejos sangrados serialmente dependiente, y la gráfica 10 de los sangrados serialmente independiente. Cada elipse de confianza representa los valores del cortisol en cada ciclo de luz-oscuridad.

TABLA 1: CARACTERISTICAS DEL RITMO CIRCADIANO DEL CORTISOL PLASMATICO EN CONEJOS MANTENIDOS BAJO 5 CICLOS DE LUZ-OSCURIDAD DIFERENTES*

Ciclo de luz-oscuridad	p	MESOR ± ES (ng/ml)	Amplitud ± ES (ng/ml) (% del MESOR)		Acrofase (95 % IC)
LO	Muestreo serialmente dependiente				
16:08	< 0,001	5,64 ± 0,43	5,37 ± 0,54	95,20 ± 9,51	-77° (-62, - 92)
14:10	< 0,001	4,93 ± 0,49	5,86 ± 0,66	118,75 ± 13,30	-43° (-31, - 58)
12:12	< 0,001	6,97 ± 0,28	5,19 ± 0,39	74,49 ± 5,60	-99° (-90, -109)
10:14	< 0,001	5,99 ± 0,45	3,16 ± 0,59	52,70 ± 9,83	-74° (-53, -100)
08:16	< 0,001	2,69 ± 0,20	2,02 ± 0,30	75,21 ± 10,98	-82° (-67, - 98)
LO	Muestreo serialmente independiente				
16:08	< 0,001	1,72 ± 0,15	1,01 ± 0,20	58,81 ± 11,50	-119° (- 90,-144)
14:10	< 0,001	1,57 ± 0,14	0,90 ± 0,18	57,17 ± 11,72	-281° (-252,-310)
12:12	0,002	2,36 ± 0,15	0,86 ± 0,24	36,32 ± 10,03	-169° (-134,-196)
10:14	< 0,001	2,88 ± 0,19	1,77 ± 0,23	61,18 ± 7,84	-45° (-29, -61)
08:16	0,003	1,61 ± 0,22	1,24 ± 0,26	77,26 ± 16,42	-34° (-1, -60)

* L=Luz; O=Oscuridad; p=valor de p de un test de amplitud 0; MESOR, media ajustada al ritmo; Amplitud, medida de la mitad de la extensión de una variación previsible durante un ciclo; Acrofase, medida temporal de los mayores valores expresada en grados (negativos), siendo 360° \equiv 24 horas; 0° =mitad del intervalo de luz; ES=error standard; IC=intervalo de confianza

TABLA 2: FORMA DE LA CURVA CIRCADIANA DEL CORTISOL PLASMATICO EN CONEJOS ALOJADOS BAJO DIFERENTES CICLOS DE LUZ, DETERMINADA MEDIANTE UN MODELO COMPUESTO CONSISTENTE EN CURVAS COSENO CON PERIODOS (τ) DE 24 Y 12 HORAS*

Ciclo luz-osc.	$\tau = 24$ horas				$\tau = 12$ horas				Total	
	PR	p	A \pm ES	ϕ (95% IC)	PR	p	A \pm ES	ϕ (95% IC)	PR	p
LO	Muestreo serialmente dependiente									
16:08	84	<0,001	5,55 \pm 0,40	-70°(-58, -83)	9	<0,001	2,02 \pm 0,44	-118°(- 86,-150)	92	<0,001
14:10	80	<0,001	6,30 \pm 0,26	-41°(-36, -47)	18	<0,001	2,75 \pm 0,35	-136°(-127,-170)	97	<0,001
12:12	90	<0,001	5,17 \pm 0,31	-100°(-93,-107)	6	<0,001	1,27 \pm 0,37	-146°(-123,-170)	96	<0,001
10:14	81	<0,001	5,43 \pm 0,29	-61°(-52, -71)	8	<0,001	3,76 \pm 0,46	-258°(-250,-266)	89	<0,001
08:16	66	<0,001	2,02 \pm 0,23	-82°(-71, -93)	23	<0,001	0,96 \pm 0,24	-210°(-188,-231)	89	<0,001
Resultados del coseno de población	80	0,019	4,58 (2,65;6,51) **	-68°(-24,-136)	13	0,028	1,12 (0,43;1,81) **	-178°(-104,-270)		
LO	Muestreo serialmente independiente									
16:08	47	<0,001	0,88 \pm 0,10	-91°(- 69,-113)	41	<0,001	0,94 \pm 0,15	-140°(-124,-156)	88	<0,001
14:10	53	<0,001	1,05 \pm 0,18	-316°(-302,-331)	30	<0,001	0,99 \pm 0,16	-189°(-172,-206)	83	<0,001
12:12	26	<0,001	0,57 \pm 0,21	-127°(- 99,-156)	50	<0,001	0,97 \pm 0,13	-212°(-187,-238)	76	<0,001
10:14	39	0,017	1,09 \pm 0,20	-45°(- 10, -80)	35	0,029	1,00 \pm 0,34	- 91°(- 69,-113)	74	<0,001
08:16	6	<0,001	0,59 \pm 0,16	-308°(-290,-326)	87	<0,001	2,01 \pm 0,11	-124°(-116,-132)	93	<0,001
Resultados del coseno de población	34	0,392	0,36 ()	-31°()	49	0,079	0,90 ()	-145°()		

* L=Luz; O=Oscuridad; A=Amplitud, medida de la mitad de la extensión de una variación previsible durante un ciclo; ϕ =Acrofase, medida temporal de los mayores valores, expresada en grados (negativos), $\tau=360^\circ$; 0° =mitad del intervalo de luz; PR=Porcentaje de ritmo, proporción de la variabilidad calculada por componente (o modelo); p=valor p de un test de amplitud=0; ES=error standard; 95%IC=95% Intervalo de Confianza

** 90% IC de A

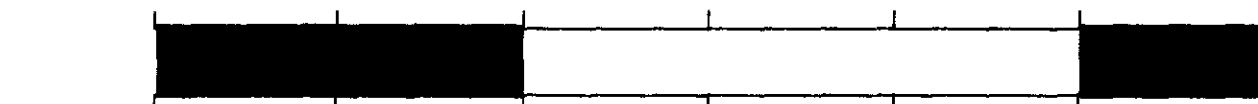
TABLA 3: COMPARACION DEL RITMO CIRCADIANO DEL CORTISOL EN MUJERES CLINICAMENTE SANAS, DURANTE INVIERNO Y OTOÑO VS PRIMAVERA Y VERANO*

población: estación	k	p	MESOR \pm ES ($\mu\text{g/dl}$)	Amplitud \pm ES ($\mu\text{g/dl}$)	Acrofase (95% IC) (grados)	Test de comparación de los parámetros	
Otoño/Invierno Primavera/Verano	72	<0,001	8,53 \pm 0,22	4,90 \pm 0,16	-134° (-129, -139)	MESOR	7,210 0,008
	68	<0,001	9,41 \pm 0,24	5,44 \pm 0,20	-133° (-129, -138)	Amplitud	4,510 0,036
						Acrofase	0,024 0,877
						(A, ϕ)	2,278 0,104
Invierno Verano	38	<0,001	8,28 \pm 0,35	4,69 \pm 0,24	-137° (-129, -145)	MESOR	3,460 0,067
	34	<0,001	9,19 \pm 0,34	5,66 \pm 0,25	-137° (-130, -144)	Amplitud	7,685 0,007
						Acrofase	0,013 0,910
						(A, ϕ)	3,717 0,027

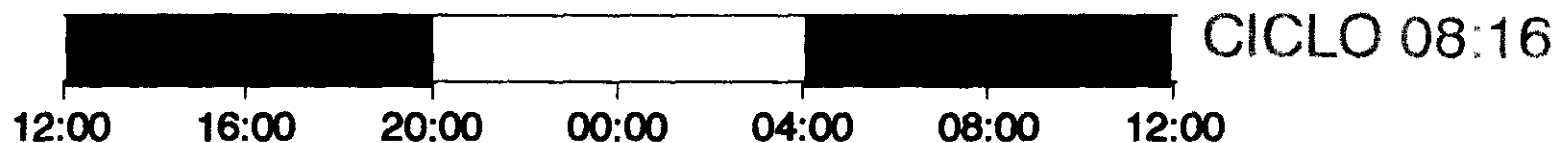
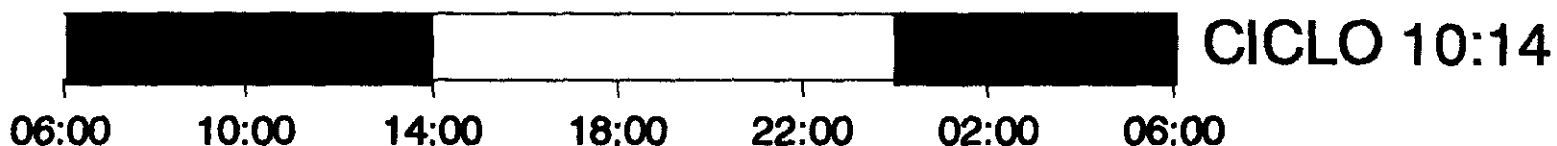
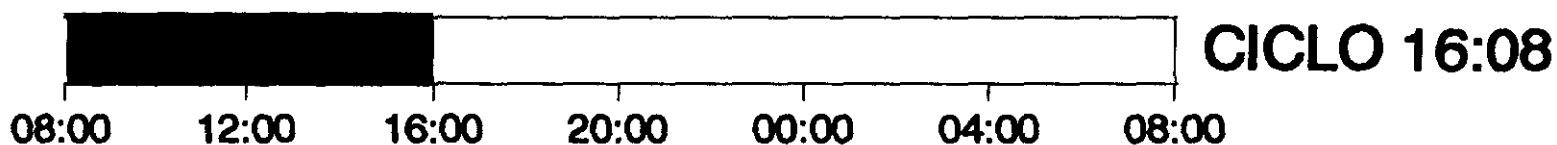
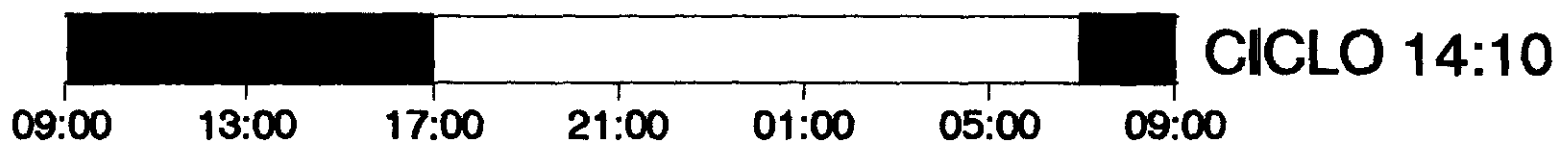
* k=número de mujeres en la población; p=valor p de un test de amplitud 0; MESOR=media ajustada al ritmo; acrofase expresada en grados (negativos), con 360° \equiv 24 horas; 0°=00:00; ES=error standard; IC=Intervalo de Confianza

Horas de reloj

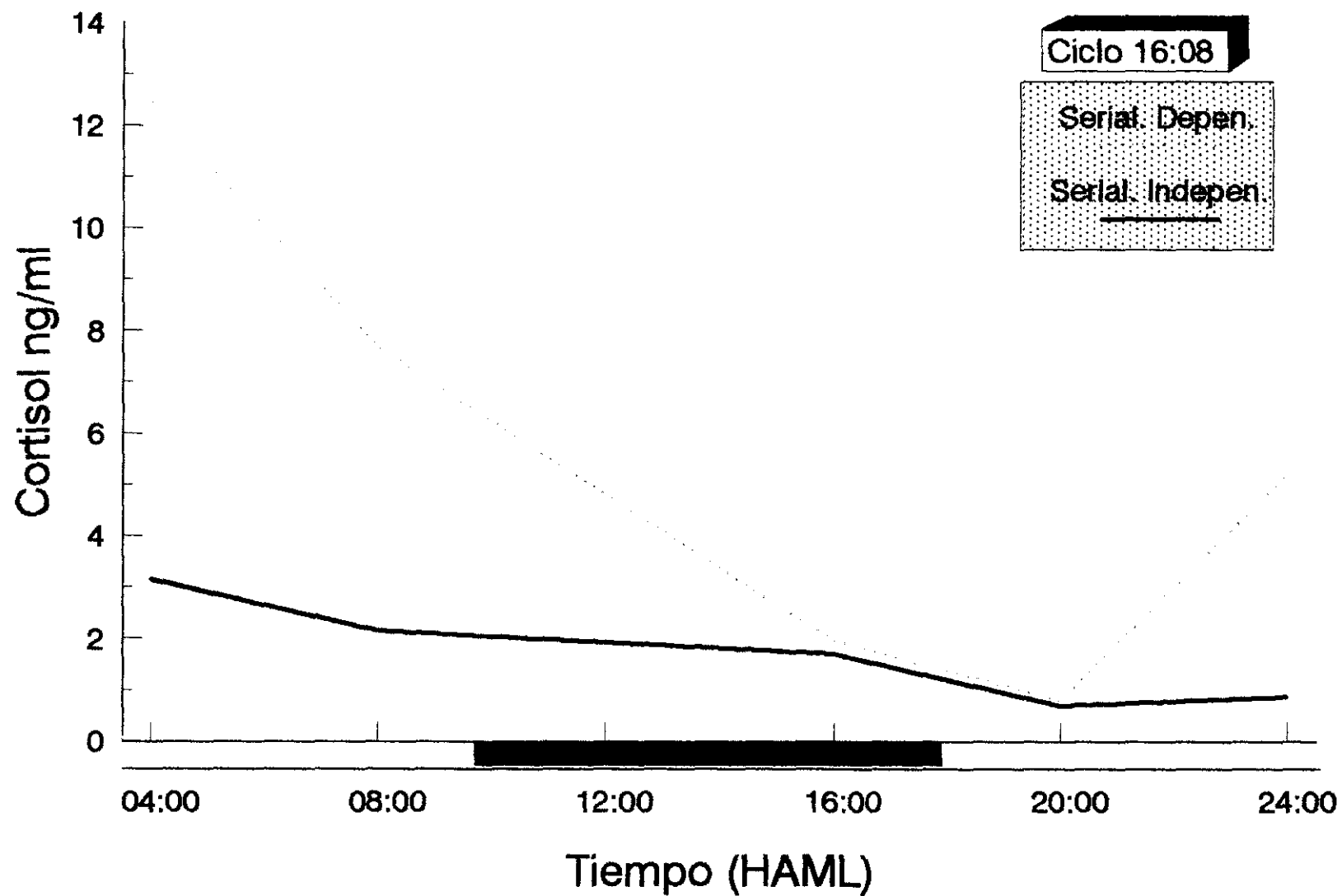
00:00 04:00 08:00 12:00 16:00 20:00 00:00



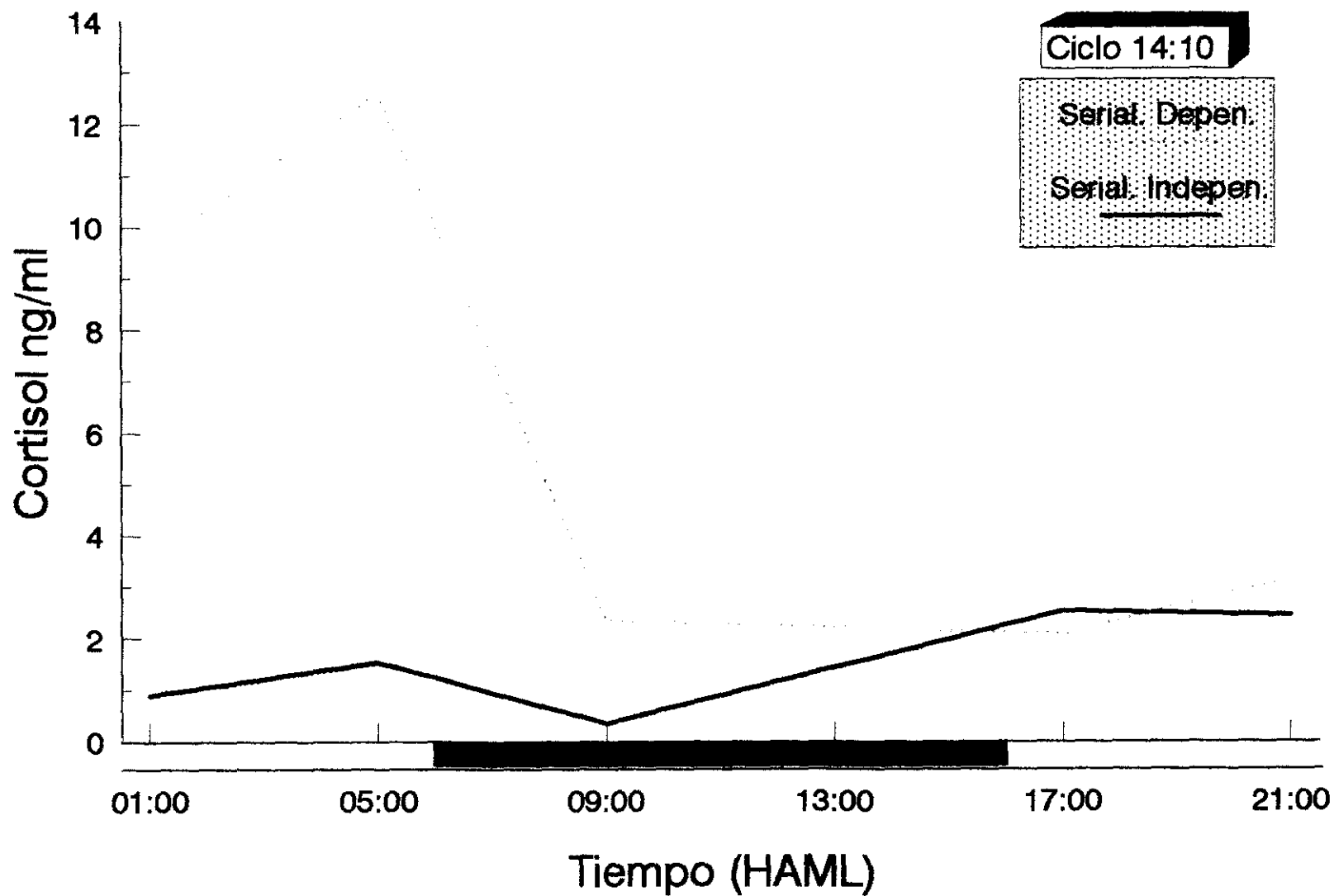
HAML



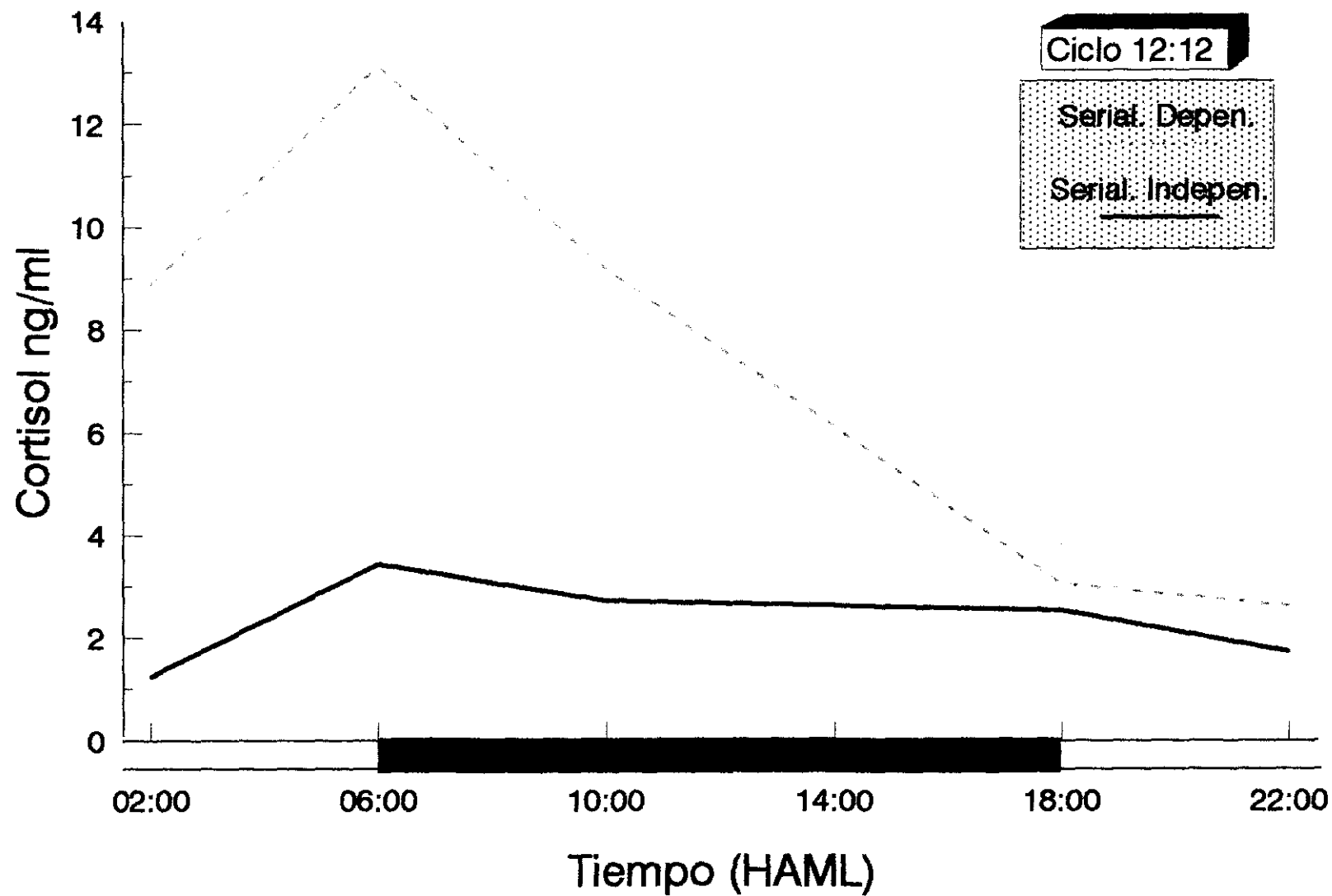
Esquema I. Horas de reloj y su relación con HAML



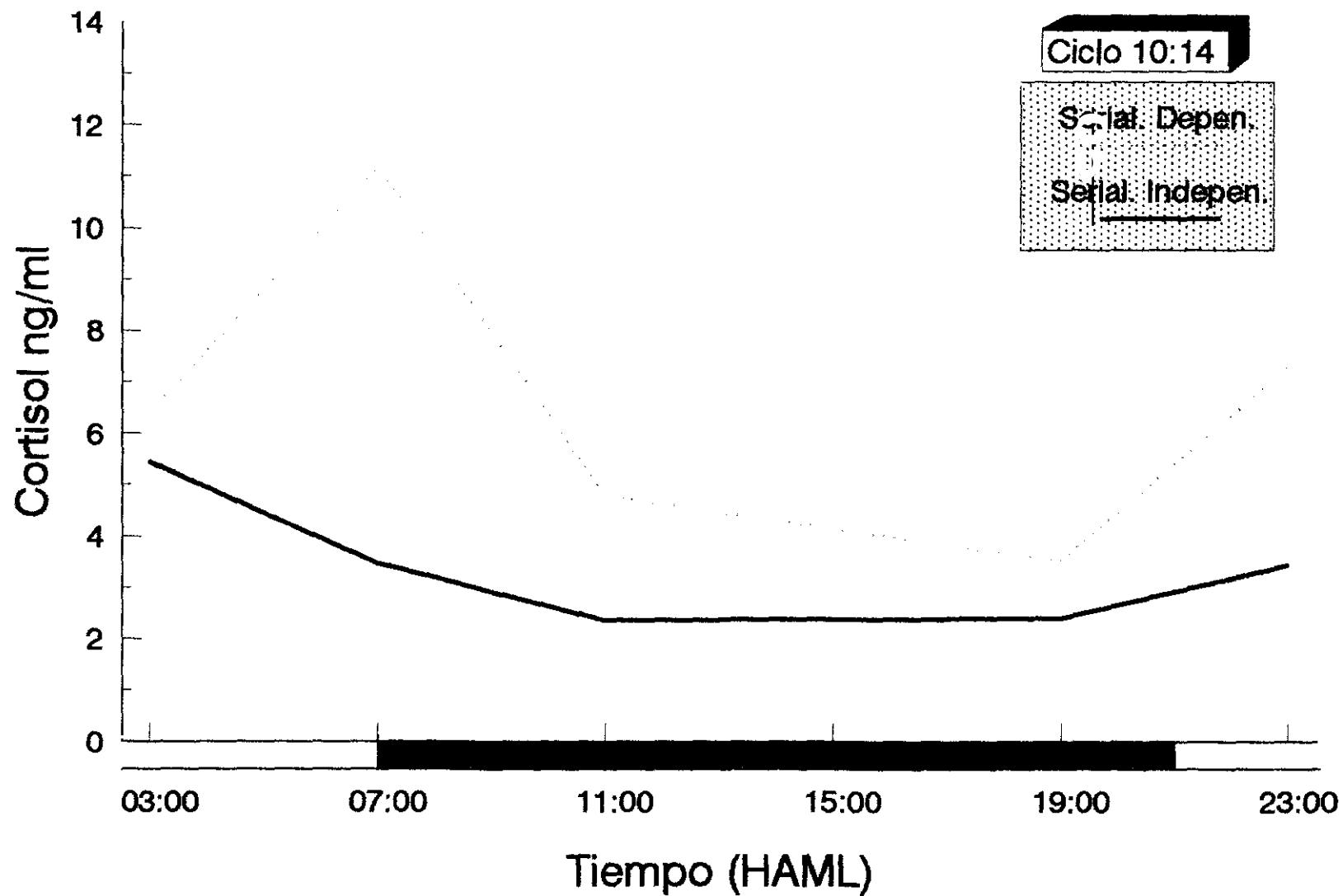
Gráfica 1



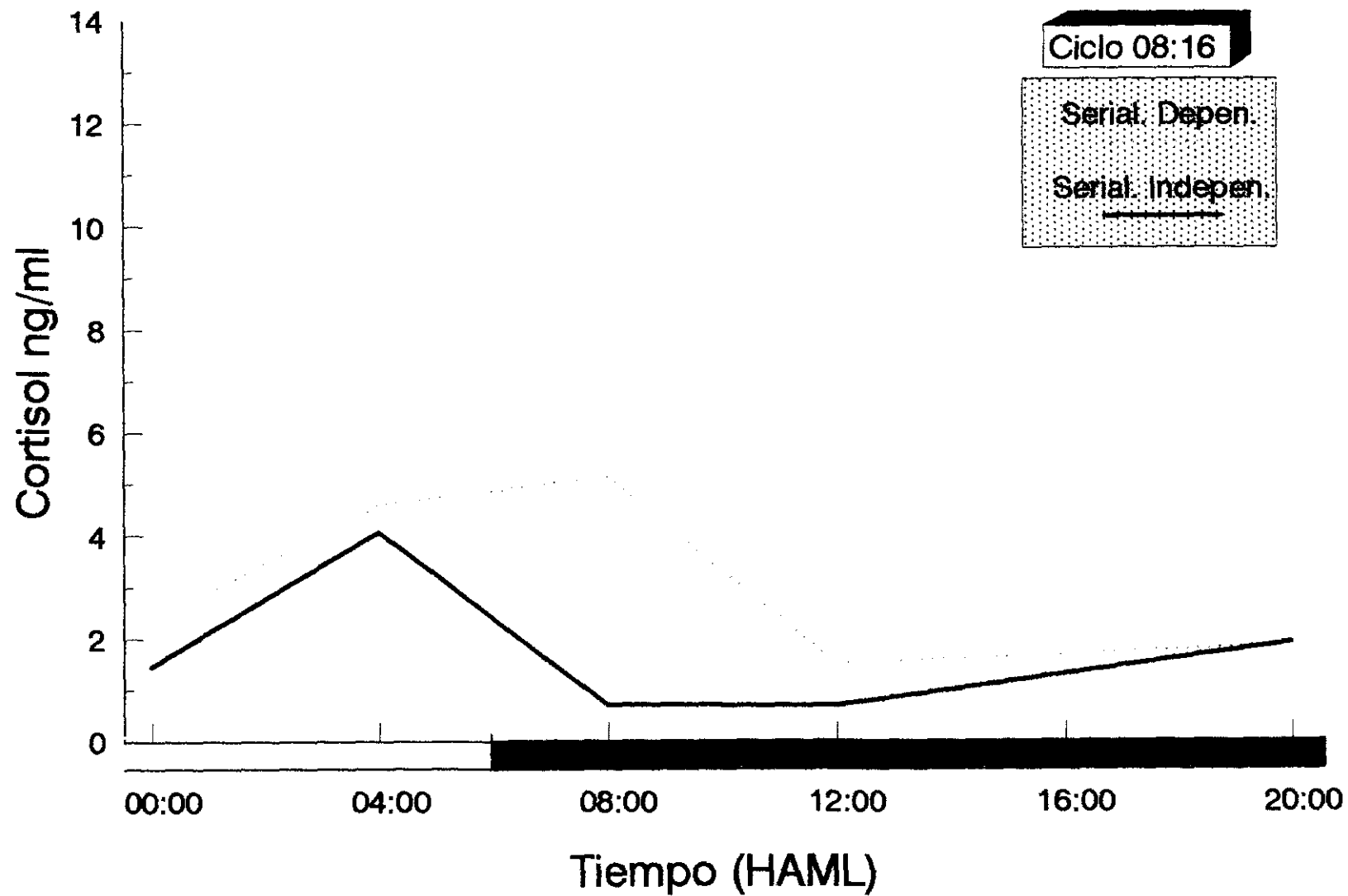
Gráfica 2



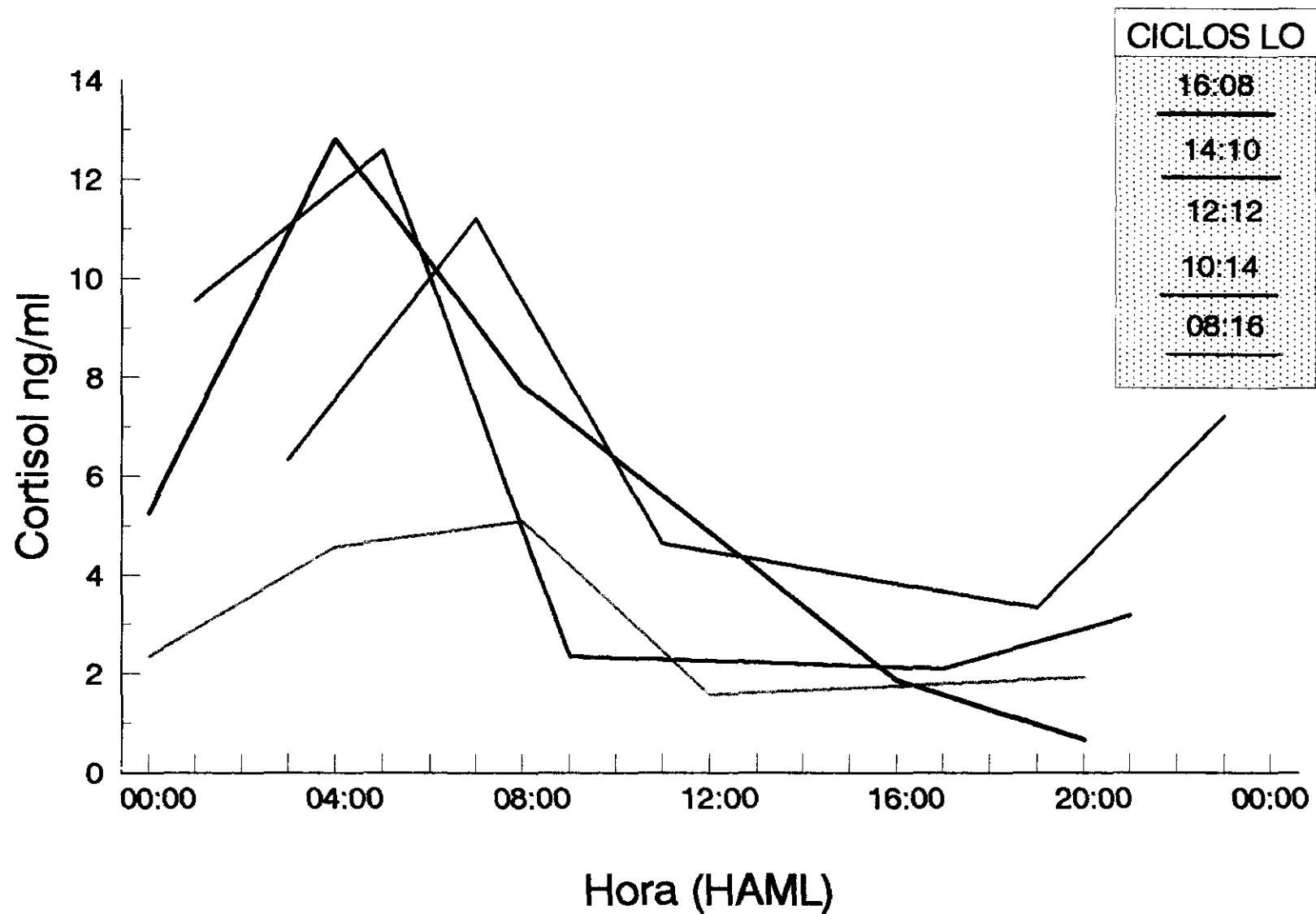
Gráfica 3



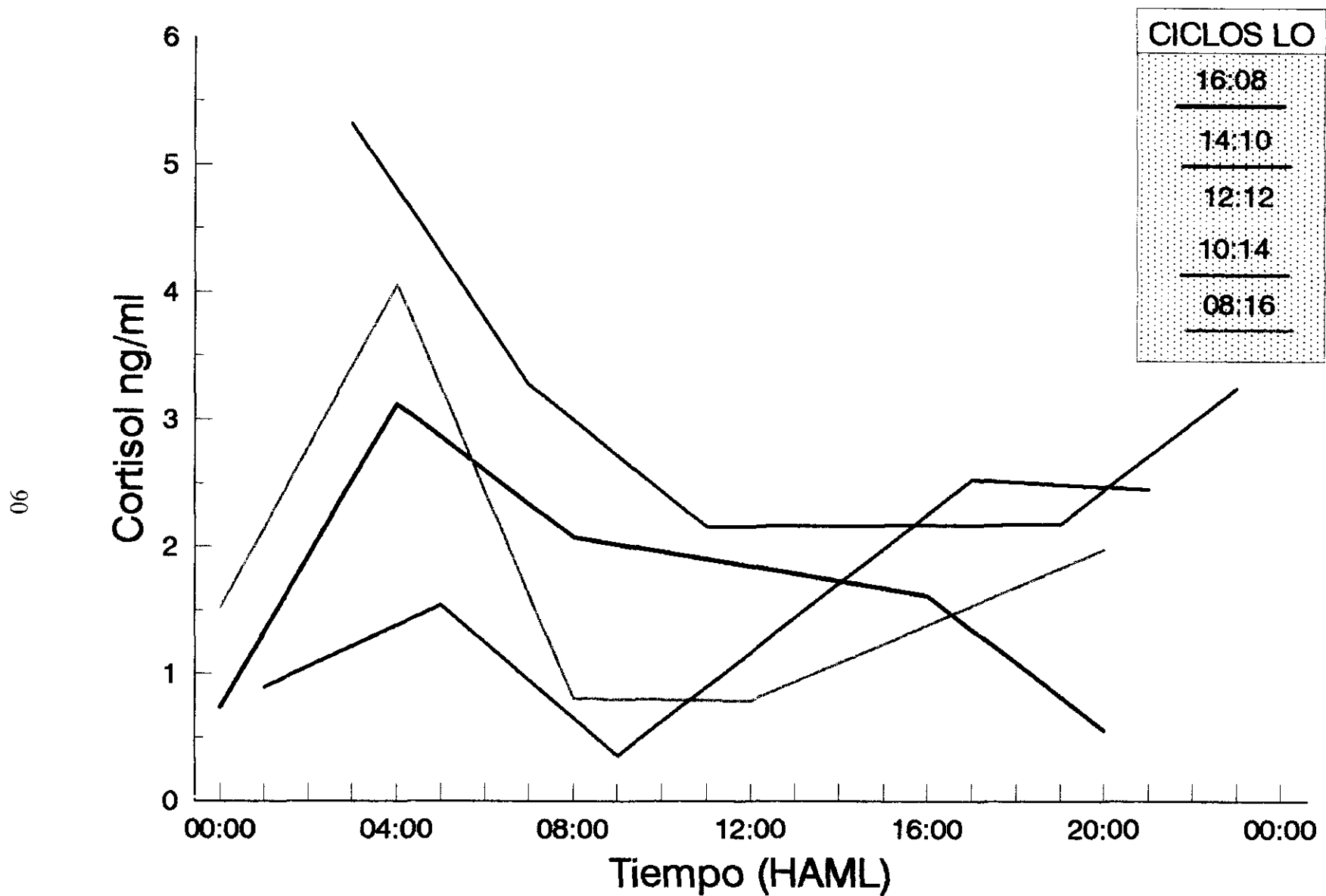
Gráfica 4



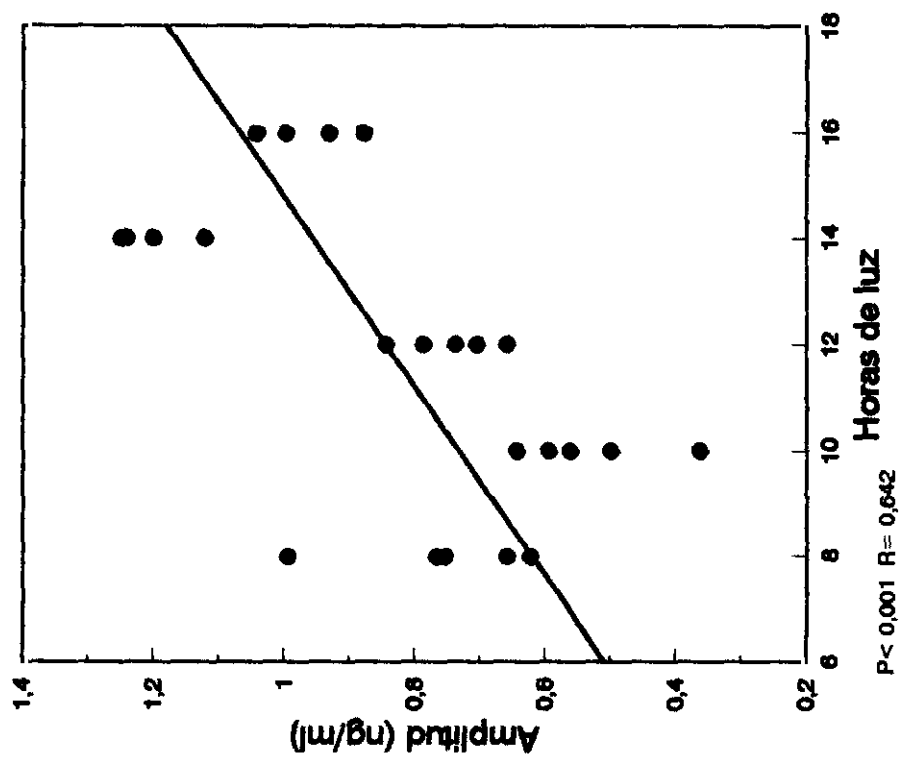
Gráfica 5



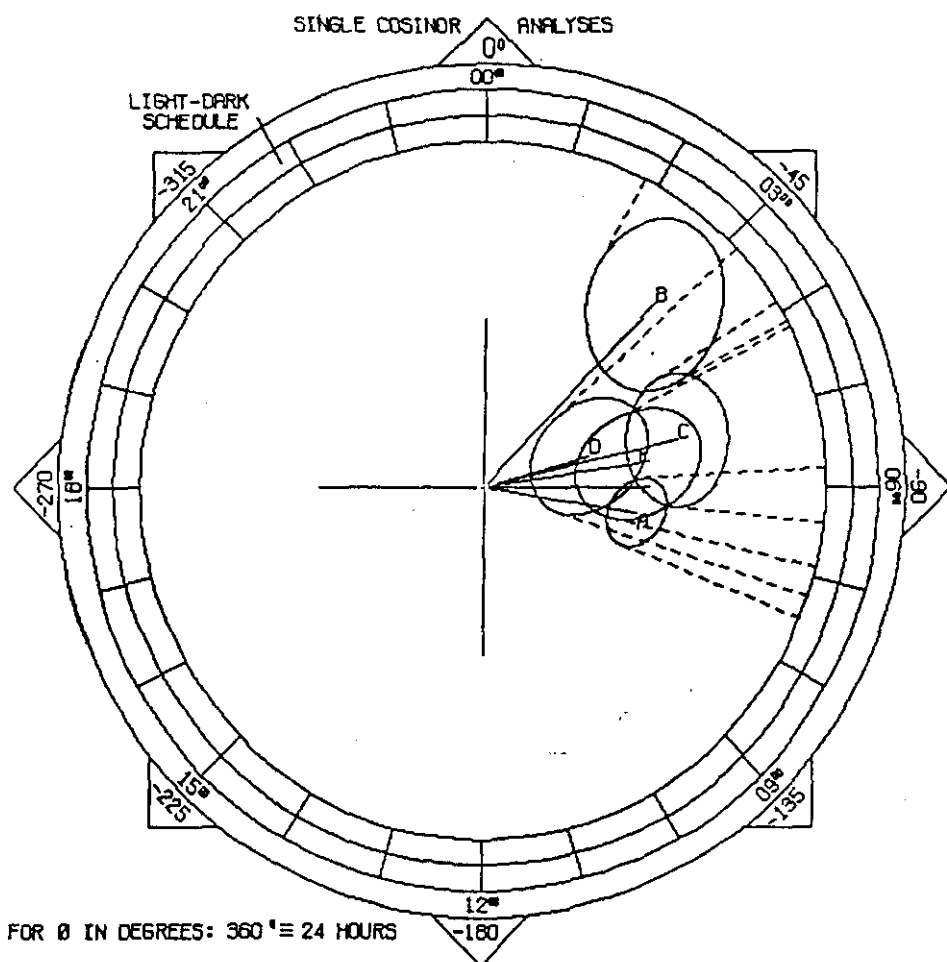
Gráfica 6. Serialmente dependiente.



Gráfica 7. Serialmente independiente.

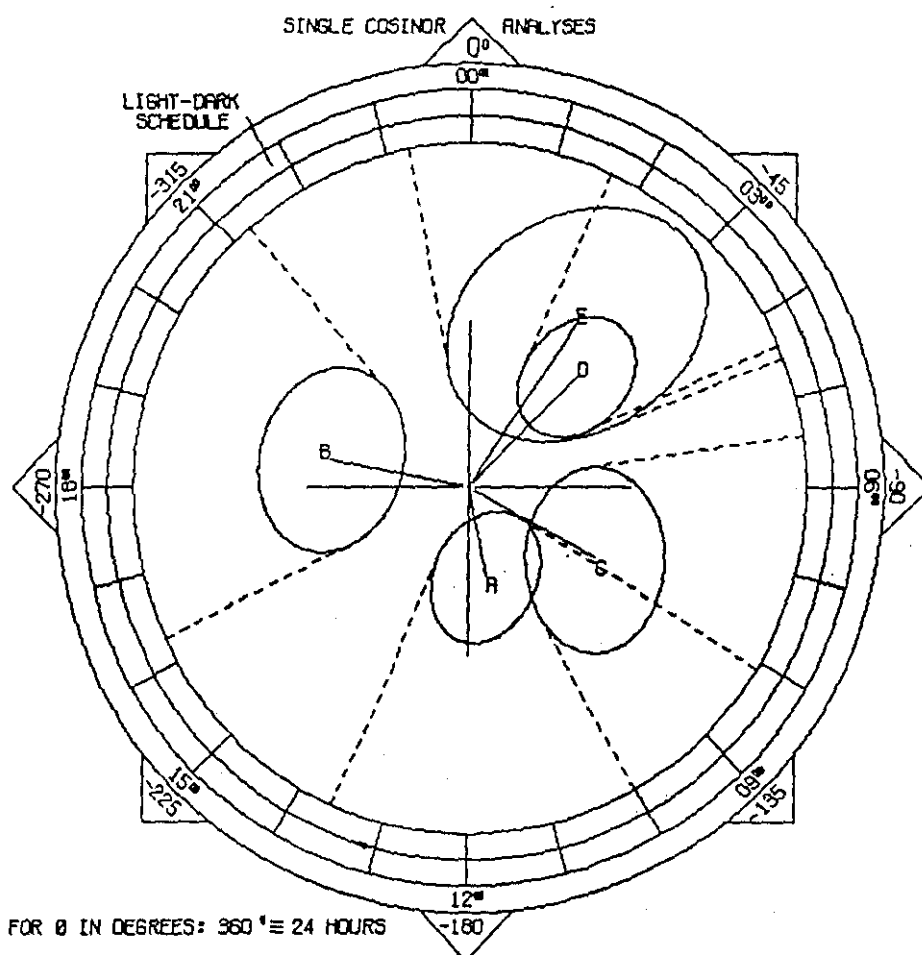


Gráfica 8



KEY	P	N	PR	MESOR \pm SE	AMPLITUDE \times (% of mesor)	ACROPHASE (θ) \times
ALD 12:12	8.001	25	91	6.97 0.28	74.49 (60.96 88.13)	-99° (-87 -112)
BLD 14:10	8.001	25	75	4.93 0.49	118.75 (79.49 158.45)	-43° (-28 -62)
CLD 16:08	8.001	25	82	5.64 0.43	95.20 (70.30 120.24)	-77° (-58 -96)
DLD 10:14	8.001	25	51	5.99 0.45	52.70 (23.57 82.42)	-74° (-47 -108)
ELD 08:16	8.001	25	66	2.69 0.20	75.21 (44.90 105.79)	-82° (-63 -103)

Gráfica 9



KEY	P	N	PR	RESOR	+SE	AMPLITUDE * (% of MESOR)	ACROPHASE (θ) *
A LD 12:12	0.002	25	42	2.36	0.15	36.32 (12.36 61.20)	-169° (-121 -204)
B LD 14:10	0.001	25	55	1.57	0.14	57.17 (28.12 86.26)	-281° (-244 -318)
C LD 16:08	0.001	25	55	1.72	0.15	58.81 (29.04 89.50)	-119° (-81 -150)
D LD 10:14	0.001	25	62	2.89	0.18	61.18 (34.61 91.77)	-45° (-25 -66)
E LD 08:16	0.009	25	41	1.61	0.22	77.26 (24.60 131.04)	-34° (-349 -68)

Gráfica 10

EXPERIMENTO 2: MARCADORES DE CRECIMIENTO, CA125 Y CA130

La tabla 4 es un resumen estadístico de los dos marcadores de crecimiento estudiados. Este resumen fue realizado en los datos originales, y en los datos transformados en logaritmos. La saliva fue recogida antes y después del enjuagado de la boca.

En la tabla 5, primero, se detalla como varían las concentraciones del CA125 y del CA130, a lo largo del día (por clases de 4 horas); tanto cuando se consideran únicamente 23 muestras (10-14 de abril), como cuando se consideran 61 muestras (10-21 de abril), en los valores originales y en los valores transformados en logaritmos. Posteriormente mediante el análisis de varianza (ANOVA) de los datos y aplicando el método cosenior a los mismos datos, obtenemos los valores de p, que nos indican en qué medida los datos dependen del tiempo. Obteniendo además, al aplicar el método cosenior, las características del ritmo, las cuales quedan reflejadas en la parte inferior de la tabla. Podemos observar las diferencias existentes entre media y MESOR.

En la tabla 6 se recogen las características de los sujetos que participan en este estudio, así como las fechas en que se llevaron a cabo éstos, y se comparan los valores del CA125 y del CA130 de dichos sujetos, uno de ellos con cáncer de ovario (101EH) y otros tres sanos (210HM, 209GC, 211AP); mostrando las diferencias de concentraciones entre el CA125 y el CA130, antes y después del enjuagado de la boca.

La tabla 7 se confeccionó con los resultados obtenidos de comprobar si las diferencias encontradas entre las concentraciones de CA125 y de CA130 eran consistentes. Para ello se analizaron series más largas, proporcionadas por una paciente con cáncer de ovario (EH). Las diferencias fueron estimadas en varios espacios de tiempo: entre 00:00 y 04:00; 04:00 y 08:00; 08:00 y 12:00; 12:00 y 16:00; 16:00 y 20:00; y 20:00 y 00:00 horas.

En la tabla 8 se resumen los análisis llevados a cabo, para conocer si las diferencias entre los dos marcadores estaban en función de las concentraciones de los mismos. Se usaron los datos de la paciente con tumor ovárico, para formar diferentes clases basadas en los valores de las concentraciones de CA125. Se consideraron las siguientes clases: CA125 entre 200 y 300 (no había valores por debajo de 200); 300 y 400; ...; 900 y 1000; 1000 y 2000; 2000 y 3000; ...; 9000 y 10000; y mayores de 10000.

En la gráfica 11 se comparan las concentraciones de los marcadores de crecimiento CA125 y CA130 salivares, de dos personas sanas, antes y después del enjuagado de la boca. En ambos sujetos se observan concentraciones menores después del enjuagado. Las diferencias de concentración entre CA125 y CA130 son estadísticamente diferentes en todos los casos (mediante un t-test por parejas)

En la gráfica 12 se comparan los MESORes del CA130 salivar entre un grupo de personas sanas ($n=2$), y otro de personas con tumores ováricos ($n=5$). Se aprecia la gran diferencia de concentración del marcador de crecimiento entre estos dos grupos, siendo ésta estadísticamente significativa.

En la gráfica 13 se comparan las distintas concentraciones del marcador CA130 salivar, entre dos grupos de sujetos sanos ($n=10$), y otros con cáncer ovárico ($n=6$). Obteniendo que la diferencia entre los MESORes, tanto en unidades originales, como en las transformadas en logaritmos, son estadísticamente significativas.

Las gráficas 14, 15, 16 y 17 son plexogramas en los que están representadas las concentraciones de los marcadores de crecimiento, a distintas horas del día. En los gráficos 14 y 15 se comparan las concentraciones de CA125 y CA130 de muestras de saliva, halladas en los datos originales (14) y en datos transformados en logaritmos (15). En los plexogramas 16 y 17 se puede ver como varían las concentraciones del CA130 a lo largo del día, con datos originales y transformados en logaritmos, en 61 muestras de saliva. En todos los plexogramas podemos ver la significación estadística del ritmo circadiano de los marcadores, hallada tanto mediante el ANOVA como por el método cosenior.

La gráfica 18 representa la curva coseno (circadiana) que mejor se adapta a los 23 datos del marcador tumoral CA125 de una mujer clínicamente sana, mediante el método lineal de los mínimos cuadrados; indicándonos cual es su MESOR, amplitud, acrofase, valor de p y porcentaje del ritmo. En el eje de ordenadas está representado el tiempo, días de abril de 1992, y en el eje de abscisas se representa las concentraciones de CA125 en U/ml.

En la gráfica 19, se observa, al igual que en la gráfica anterior, que la curva coseno que mejor se adapta a los 61 datos del CA130 es una curva circadiana, y también las características del ritmo obtenidas mediante el método lineal de los mínimos cuadrados. En el eje de ordenadas está representado el tiempo (días de Abril de 1992), y en el de abscisas las concentraciones del marcador CA130 (U/ml).

La gráfica 20 representa la curva coseno que mejor se adapta a los 14 datos del marcador crecimiento CA130 en otro sujeto (GC) en este caso, y a diferencia del anterior, la curva que mejor se adapta no es una curva circadiana sino circasemiseptana. En este gráfico también se obtienen los valores del MESOR, amplitud, acrofase, valor de p y porcentaje del ritmo. En el eje de ordenadas está representado el tiempo, en días de abril de 1992, y en el eje de abscisas se representa las concentraciones de CA130, en U/ml.

La gráfica 21 es una representación de la amplitud del CA130, como espectro de frecuencias, de tres sujetos clínicamente sanos. En los dos de la izquierda (AP y JH) se observa una prominencia del espectro circadiano (24 horas); mientras que el sujeto cuyo espectro está representado a la derecha (GC), presenta un ritmo circasemiseptano (84 horas) predominante, con ausencia del ritmo circadiano.

Las gráficas 22 y 23 representan parte del cronoma de una paciente con un adenocarcinoma que envuelve el ovario, obtenido de un total de 669 muestras de saliva recogidas entre el 23 de Enero y el 6 de Julio de 1992. Aparte del ritmo circadiano prominente con $\tau = 24$ horas y dos armónicos de 12 y 8 horas, de ambos marcadores de crecimiento (parte superior de las gráficas), podemos ver que el CA125

presenta un ritmo circaseptano sincronizado de 7 días y un componente de 22,7 días, mientras que el CA130 presenta ritmos infradianos diferentes a los del CA125: circanuales, circadiseptano y un ritmo circaseptano desincronizado $\tau = 7,6$ días ($p=0,009$) (parte inferior de las gráficas).

En la gráfica 24 se observa la evolución detallada de los dos marcadores de crecimiento a lo largo de la escala circadiana, cuando representamos los datos del CA125 y del CA130, de EH, en un plexograma circadiano; en el que los datos de aproximadamente 4 meses se agrupan en un periodo "ideal" de 24 horas (ideal, puesto que en él se incluyen la totalidad de los datos), asignándose dichos datos a 24 clases diferentes de 1 hora. Se observa que ambos marcadores presentan un ritmo circadiano muy similar, demostrado estadísticamente, tanto mediante ANOVA como por el método cosenar. Esto nos da una aproximación de la evolución de estos marcadores, a lo largo del día, así como las concentraciones aproximadas en cada hora (clase). Los valores máximos se producen entre las 06:00 y las 07:00, similares a los descritos anteriormente en los gráficos 14 a 17, en los que los valores máximos se alcanzaban entre las 04:00 y las 08:00, al ser las clases de 4 horas. Se observa con un segundo pico entre las 18:00 y las 19:00.

En la gráfica 25 está representado el patrón circaseptano descrito por el CA125 salivar de una paciente con cáncer. En este plexograma vemos que los valores máximos del CA125 se producen los lunes, y en menor medida los domingos. Los 513 datos, recogidos entre el 22 de Febrero y el 29 de Mayo de 1992, se agruparon en 7 clases, de 24 horas cada clase, correspondiéndose cada una, con un día de la semana, comenzando por el domingo.

Estos marcadores de crecimiento, hasta ahora exclusivos de la especie humana, fueron determinados también en diferentes especies animales, en suero y/o saliva. Estos resultados aparecen en la gráfica 26, junto con los de otras mujeres con cáncer ginecológico, con ovarios poliquísticos, sanas y con los de un hombre.

En la gráfica 27 se aprecia que las concentraciones de CA125 y CA130 salivares están correlacionadas de forma positiva con las séricas, y son mucho más altas en el primer fluido, que en el segundo, en humana, siendo la relación saliva/suero > 30 en personas sanas; la relación en ratas fue de 1,76. Resultados basados en 3 muestras de suero frente a 8 de saliva, y la relación en vacas es de 1,58 (basado en 14 muestras de saliva frente a 2 de suero), similar al observado en ratas.

TABLA 4: RESUMEN ESTADISTICO DE LOS MARCADORES DE CRECIMIENTO CA125 Y CA130 DETERMINADOS EN MUESTRAS DE SALIVA

	ANTES DEL ENJUAGADO DE LA BOCA				DESPUES DEL ENJUAGADO DE LA BOCA			
ESTADISTICA	CA125	CA130	Log ₁₀ CA125	Log ₁₀ CA130	CA125	CA130	Log ₁₀ CA125	Log ₁₀ CA130
Media ± ES	1158±248	975±196	2,941±0,061	2,882±0,057	404±38	444±29	2,572±0,035	2,629±0,025
Mínimo	460	334	2,663	2,524	216	310	2,334	2,491
Máximo	5146	4246	3,711	3,628	900	832	2,954	2,920
Mediana	676	596	2,830	2,775	348	394	2,541	2,595

* 23 Muestras de saliva recogidas entre el 10 y el 14 de Abril de 1.992 en una mujer clínicamente sana, AP (28 años); CA125 y CA130 expresados en U/ml;
ES=error standard

TABLA 5: PERFILES CIRCADIANOS DEL CA125 Y CA130 SALIVARES EN UNA PERSONA SANA, MEDIANTE ANOVA Y COSENO SIMPLE *

ESTADO CIRCADIANO (horas)	N 10-14/04	N 10-21/04	CA125 10-14/04	CA130 10-14/04	CA130 10-21/04	Log CA125 10-14/04	Log CA130 10-14/04	Log CA130 10-21/04
00:00-04:00	2	3	792 ± 332	688 ± 196	675 ± 114	2,860 ± 0,190	2,820 ± 0,130	2,820 ± 0,070
04:00-08:00	2	7	3165 ± 949	2487 ± 717	3032 ± 529	3,480 ± 0,130	3,380 ± 0,130	3,420 ± 0,110
08:00-12:00	5	11	1730 ± 874	1457 ± 714	1475 ± 452	3,060 ± 0,180	3,000 ± 0,170	2,980 ± 0,120
12:00-16:00	5	13	557 ± 22	506 ± 46	580 ± 46	2,740 ± 0,020	2,700 ± 0,040	2,750 ± 0,030
16:00-20:00	5	12	830 ± 207	728 ± 137	664 ± 66	2,880 ± 0,090	2,830 ± 0,080	2,800 ± 0,040
20:00-24:00	4	15	784 ± 89	658 ± 50	462 ± 55	2,890 ± 0,050	2,810 ± 0,030	2,610 ± 0,070
TOTAL	23	61	1158 ± 248	975 ± 196	1015 ± 144	2,940 ± 0,060	2,880 ± 0,060	2,850 ± 0,040
F			2,395	2,230	12,168	3,149	3,081	11,186
p(ANOVA)			0,081	0,099	<0,001	0,034	0,037	<0,001
p(Coseno Simple)			0,090	0,092	<0,001	0,066	0,058	<0,001
MESOR ± ES			1301 ± 257	1085 ± 203	1195 ± 129	2,991 ± 0,062	2,927 ± 0,058	2,891 ± 0,039
Amplitud ± ES			854 ± 385	658 ± 310	1020 ± 194	0,236 ± 0,087	0,221 ± 0,083	0,292 ± 0,061
Acrofase (límites de confianza)			-89°(-53,-148)	-92°(-55,-153)	-92°(-74,-115)	-79°(-47,-124)	-82°(-51,-128)	-99°(-80,-125)

Los valores de la tabla están referidos a la Media ± ES; ES=error standard

¹ Para las series de 23 datos se dan límites de confianza del 90%, mientras que para las series de 61 datos se dan límites de confianza del 95%

* Muestras de saliva recogidas entre el 10 y el 21 de Abril de 1.992, de una mujer clínicamente sana (28 años de edad) antes del enjuagado de la boca; CA125 y CA130 expresados en U/ml

TABLA 6: MARCADORES DE CRECIMIENTO, CA125 Y CA130, SALIVARES EN UNA PACIENTE CON CANCER (101 EH) Y EN 3 MUJERES CLINICAMENTE SANAS

Sujeto ID	Edad (Años)	N	Periodo del estudio (en 1992)	Media \pm ES (U/ml)					
				Antes del enjuagado de la boca			Después del enjuagado de la boca		
				CA125 (1)	CA130 (2)	Diferencia (2)-(1)	CA125 (3)	CA130 (4)	Diferencia (4)-(3)
101EH	72	456 11	02/21-06/12 04/22-04/24	3429 \pm 144	2065 \pm 82	-1364	985 \pm 261	672 \pm 153	-313
				2050 \pm 687	1584 \pm 487	-466			
210HM	77	10	04/09-04/12	1527 \pm 416	1287 \pm 351	-240			
209GC	42	34	04/07-04/14	1773 \pm 101	1544 \pm 70	-229	1164 \pm 114	1037 \pm 58	-127
211AP	28	23	04/10-04/14	1158 \pm 248	975 \pm 196	-183	404 \pm 38	444 \pm 29	40

* Medias y error standard (ES) obtenidos mediante análisis de varianza.

TABLA 7: DIFERENCIAS ENTRE LOS MARCADORES DE CRECIMIENTO CA125 Y CA130 EN FUNCION DEL ESTADO CIRCADIANO*

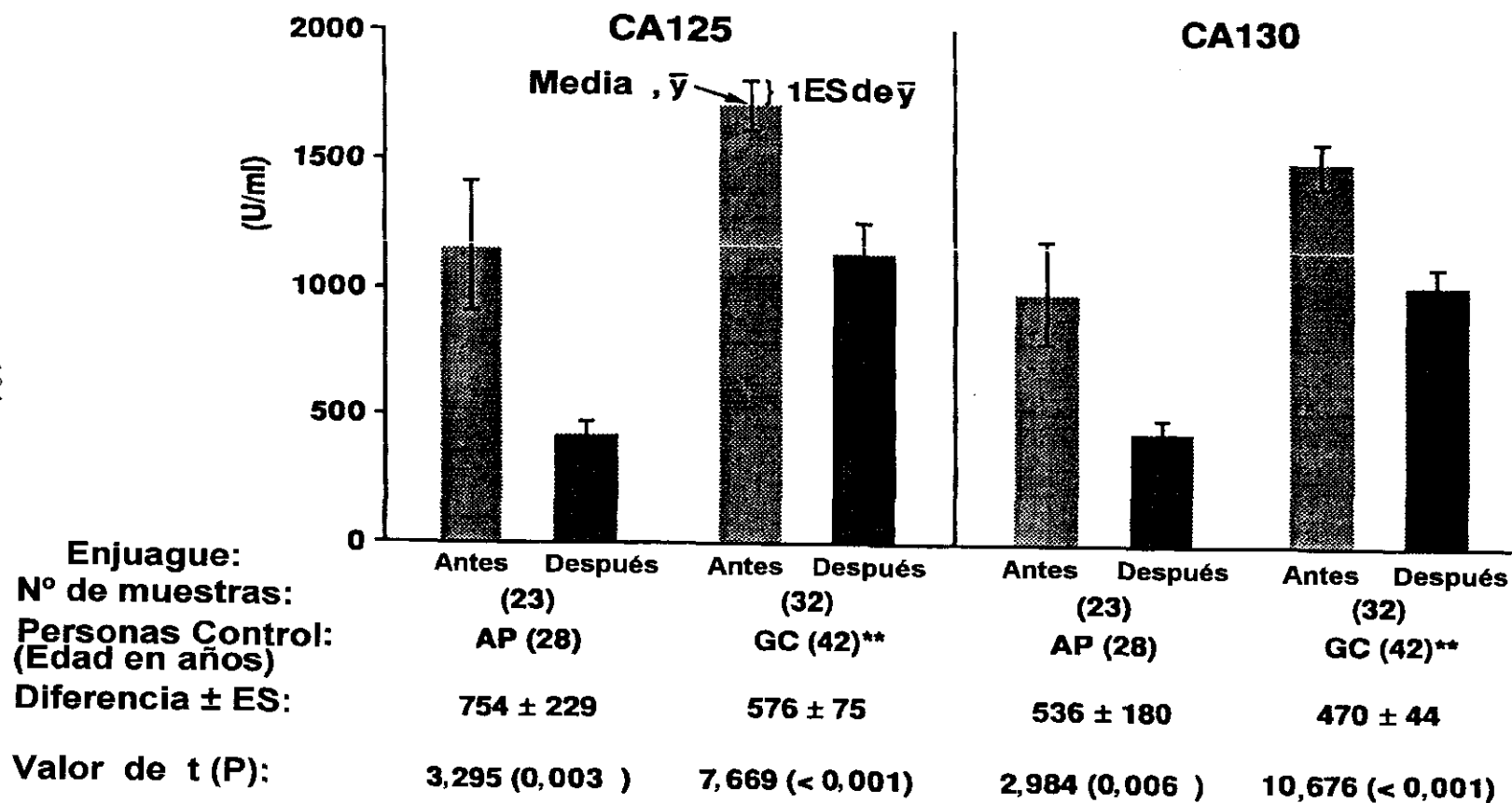
Estado Circadiano (horas)	Media \pm ES			
	N	CA125 (U/ml) (1)	CA130 (U/ml) (2)	Diferencia (2)-(1)
00:00-04:00	81	5188 \pm 326	2968 \pm 159	-2220
04:00-08:00	101	6386 \pm 303	3856 \pm 137	-2580
08:00-12:00	75	2050 \pm 223	1292 \pm 137	-758
12:00-16:00	63	1405 \pm 163	859 \pm 90	-546
16:00-20:00	69	1623 \pm 125	1043 \pm 85	-580
20:00-24:00	67	2149 \pm 282	1324 \pm 153	-825

* CA125 y CA130 determinados en la saliva de una paciente con cáncer (72 años); 456 muestras recogidas entre el 21 de Febrero y el 6 de Junio de 1992, antes del enjuagado de la boca; ES=error standard

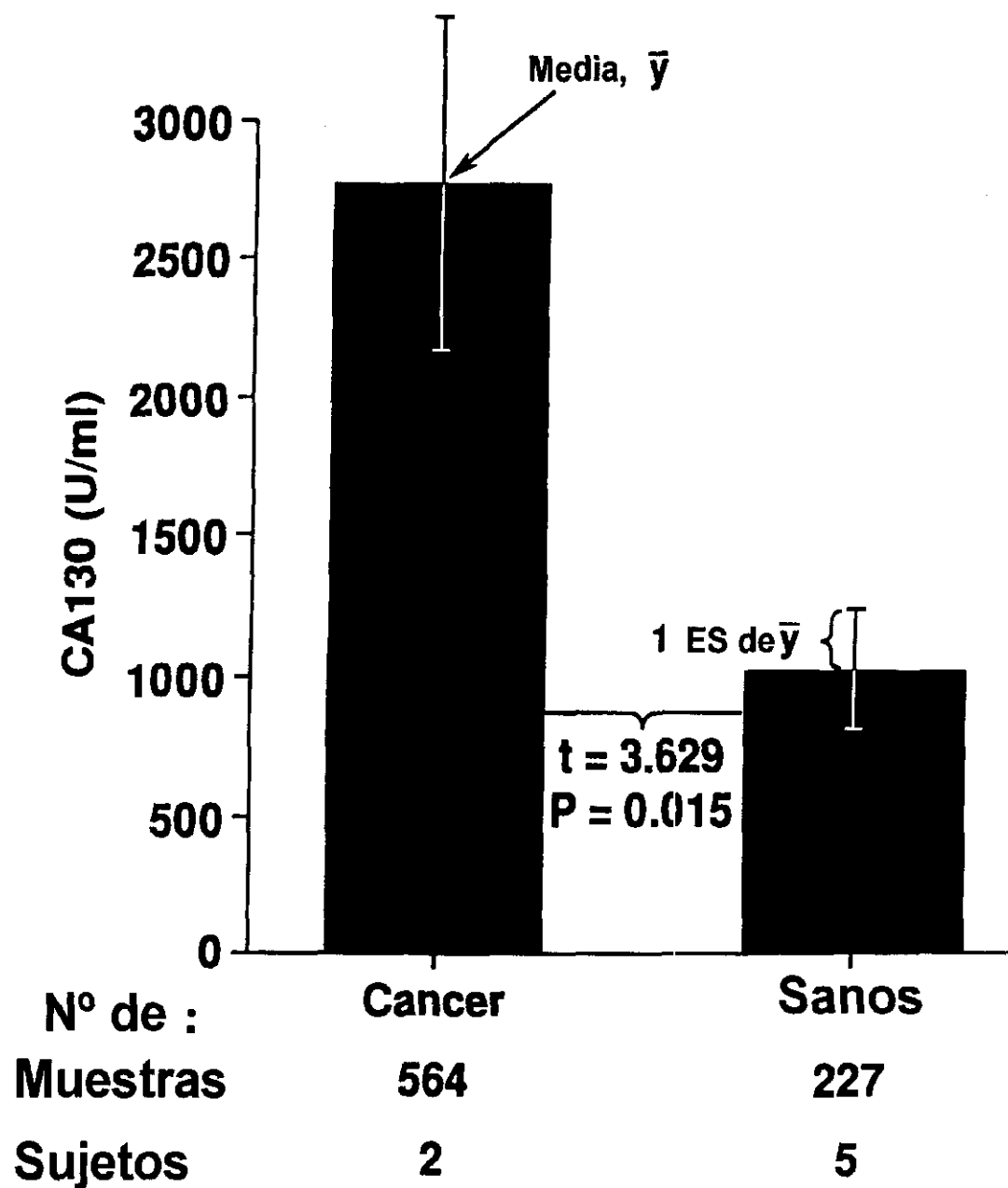
TABLA 8: COMPARACION ENTRE LOS MARCADORES DE CRECIMIENTO, CA125 Y CA130, EN UNA PACIENTE CON CANCER DE OVARIO PARA DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CA125*

CA125 (U/ml)	N	Media \pm ES	
		CA125(U/ml)	CA130(U/ml)
200-300	7	264 \pm 7	200 \pm 16
300-400	15	348 \pm 6	269 \pm 17
400-500	16	453 \pm 7	332 \pm 16
500-600	20	550 \pm 6	403 \pm 27
600-700	13	641 \pm 7	500 \pm 31
700-800	11	750 \pm 9	512 \pm 40
800-900	19	865 \pm 6	569 \pm 38
900-1000	18	947 \pm 7	647 \pm 37
1000-2000	86	1471 \pm 32	984 \pm 31
2000-3000	57	2506 \pm 37	1607 \pm 65
3000-4000	51	3407 \pm 40	2244 \pm 88
4000-5000	27	4469 \pm 56	3252 \pm 237
5000-6000	29	5540 \pm 53	3356 \pm 157
6000-7000	18	6435 \pm 75	3912 \pm 187
7000-8000	12	7302 \pm 75	4039 \pm 242
8000-9000	18	8347 \pm 58	4713 \pm 247
9000-10000	13	9534 \pm 61	5076 \pm 417
> 10000	8	12846 \pm 906	6292 \pm 587

* 438 muestras de saliva sin estimular (sin enjuagarse la boca), recogidas entre el 6 de Marzo y el 27 de Mayo de 1.992; N=n° de datos por clase; ES=error standard

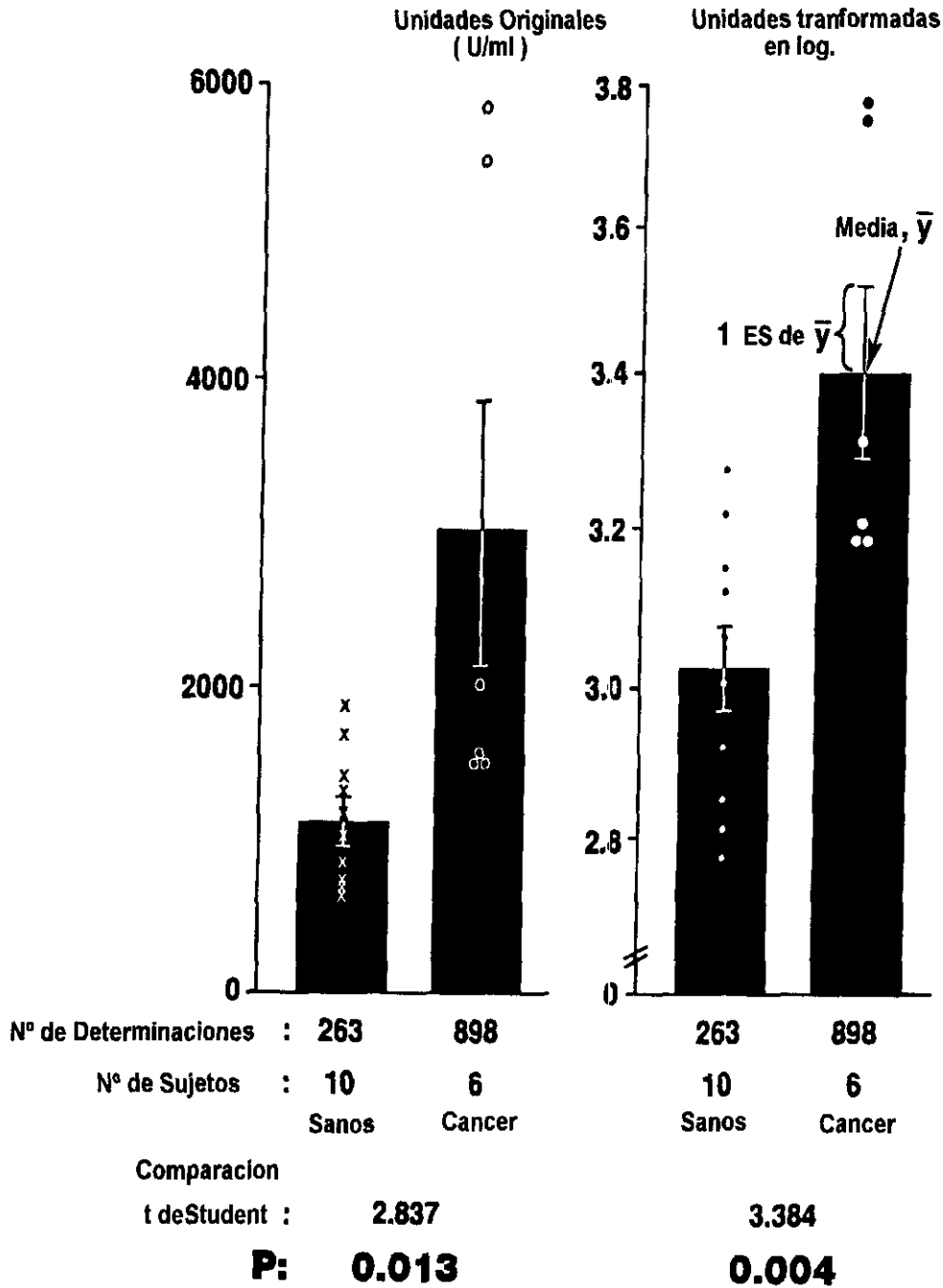


Gráfica 11

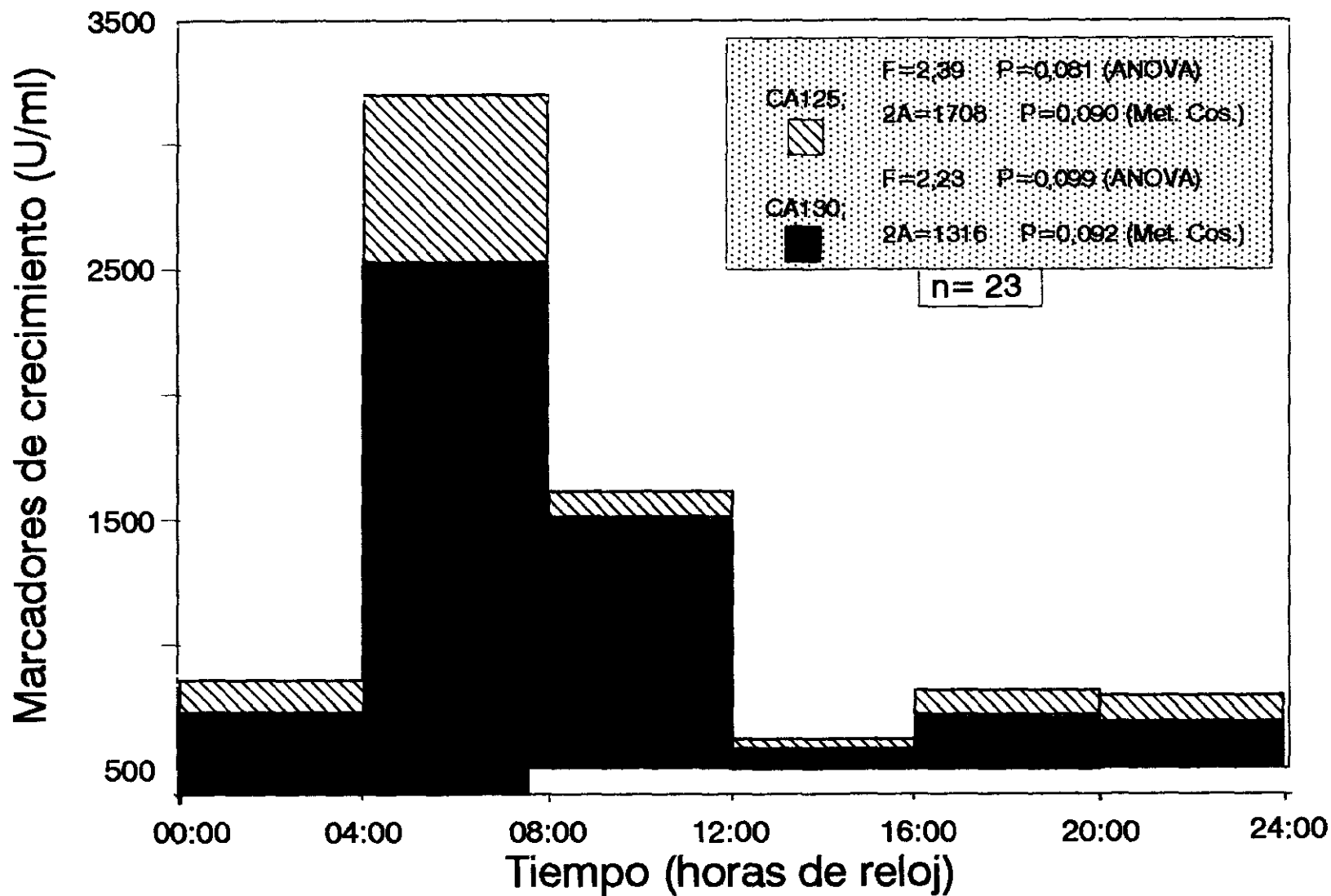


Gráfica 12

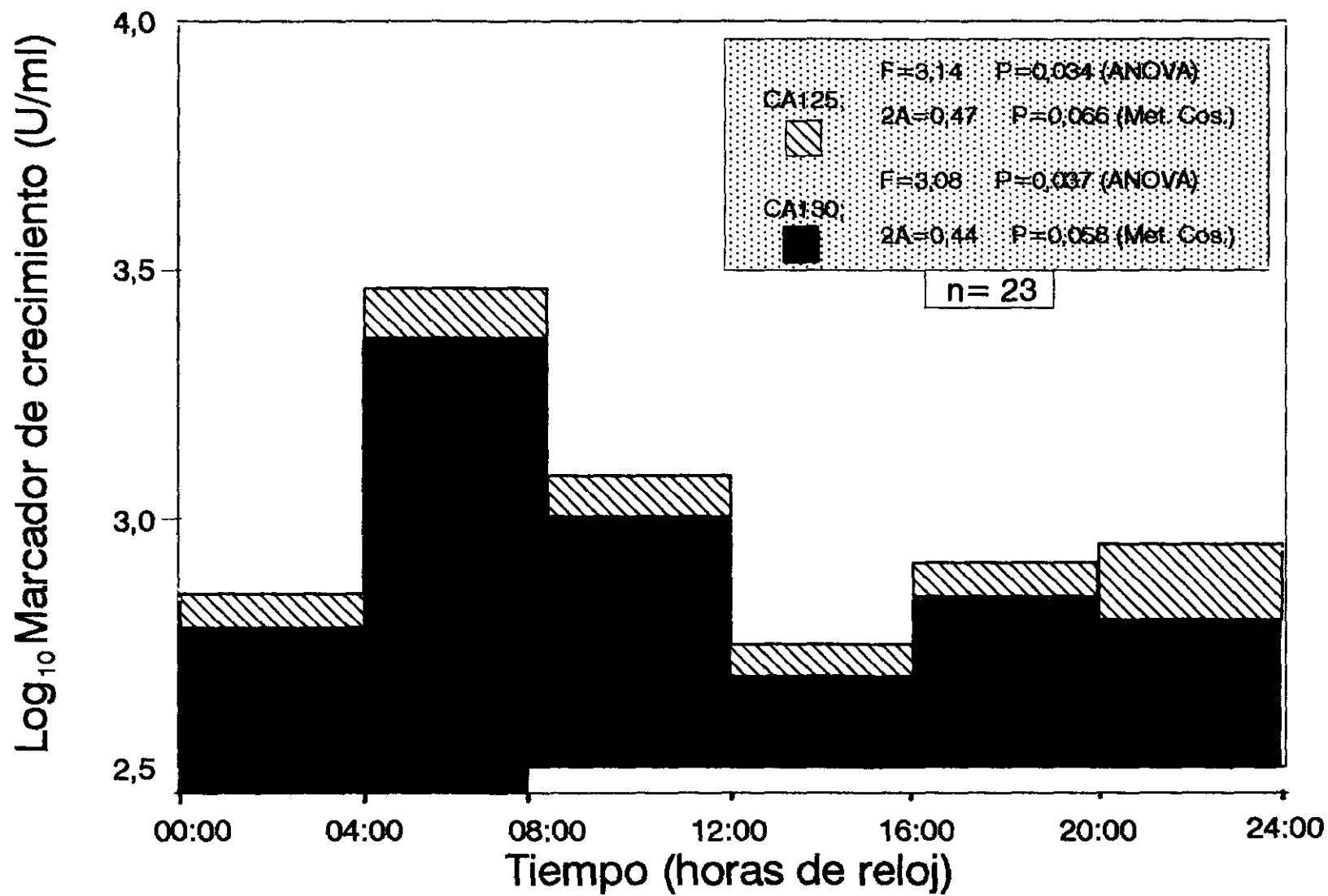
Medias Ajustadas al Ritmo (MESORes) en:



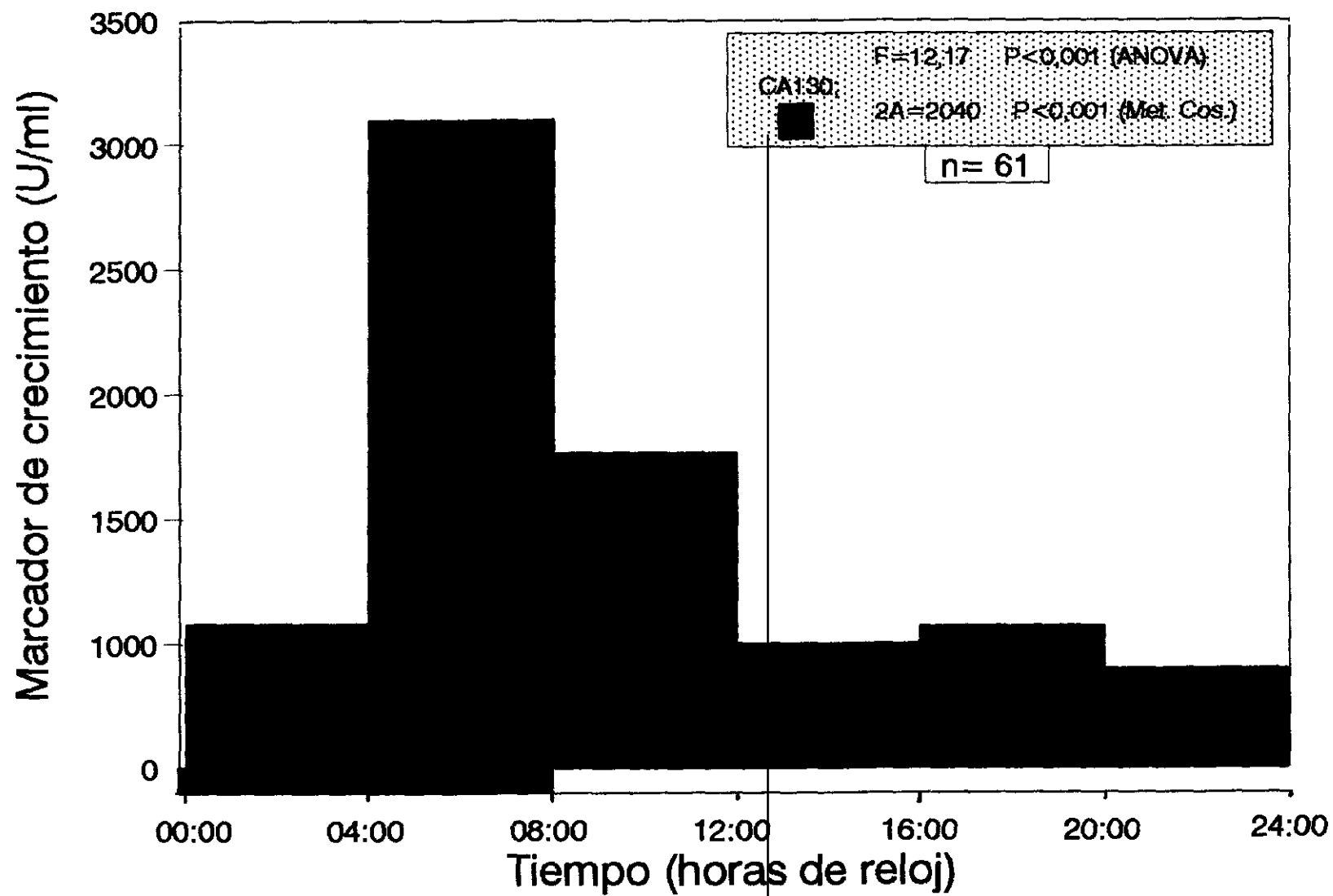
Gráfica 13



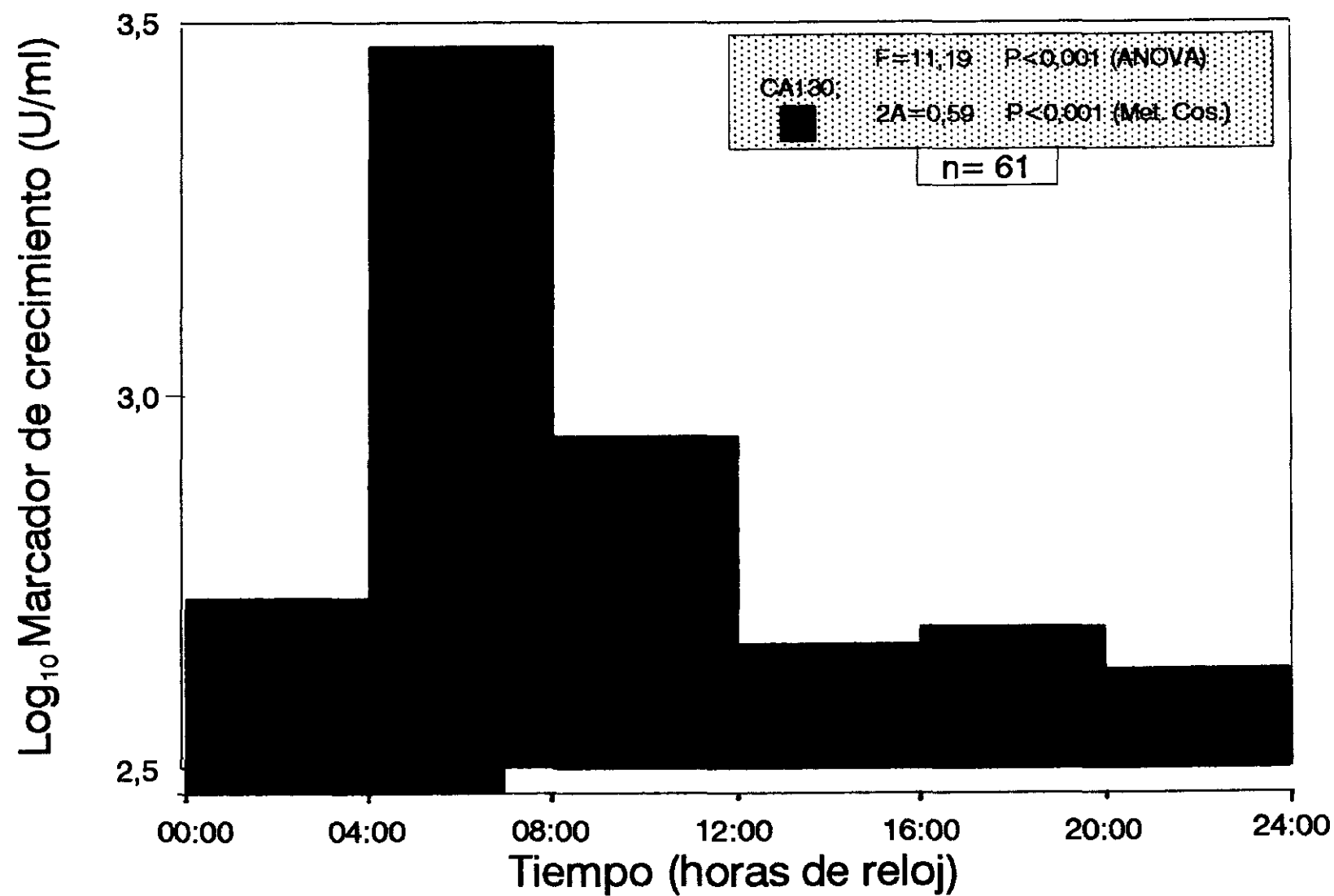
Gráfica 14



Gráfica 15

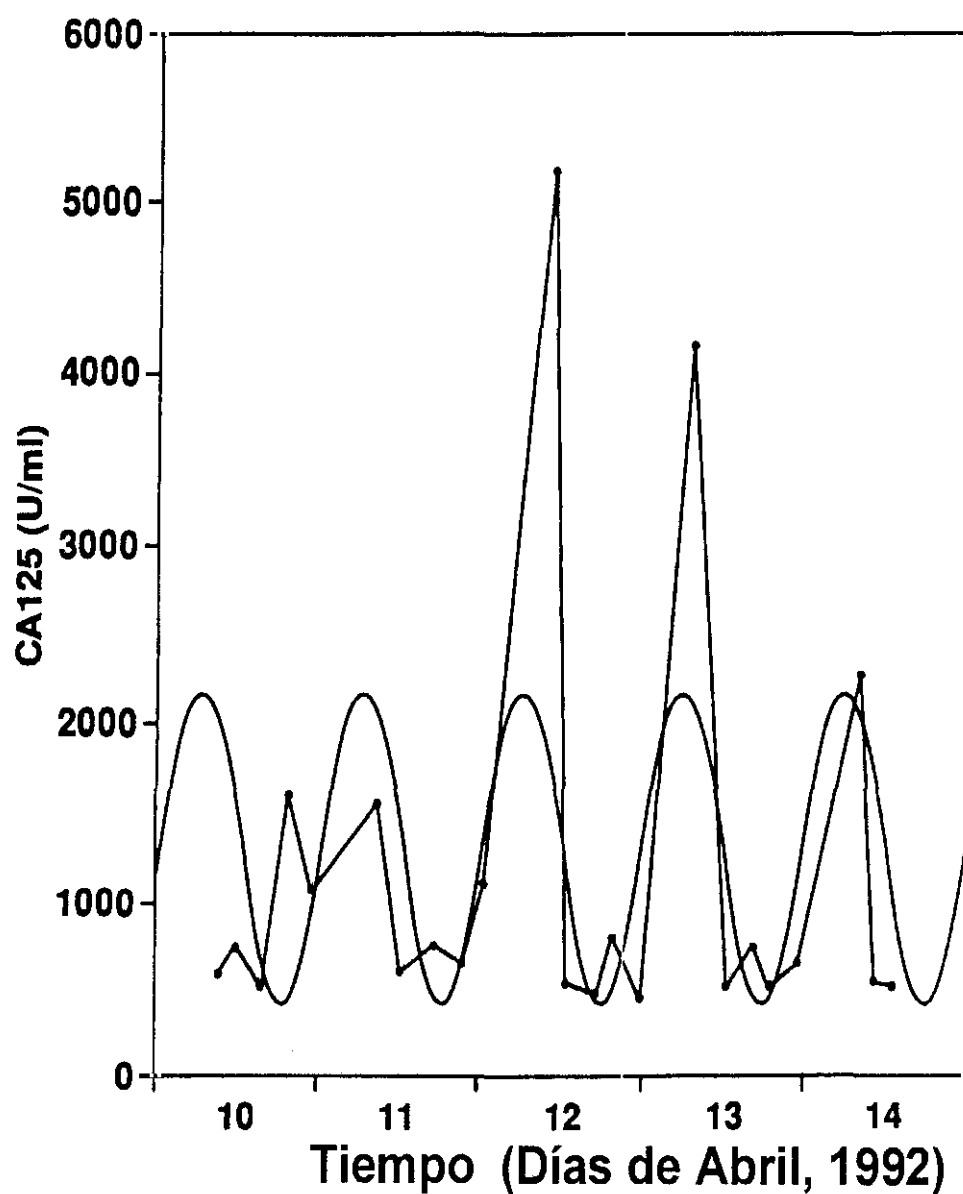


Gráfica 16



Gráfica 17

Ritmo circadiano del CA125



Periodo Ajustado= 24 horas

Valor de P= 0,090

MESOR = 1310

Porcentaje Ritmo = 21

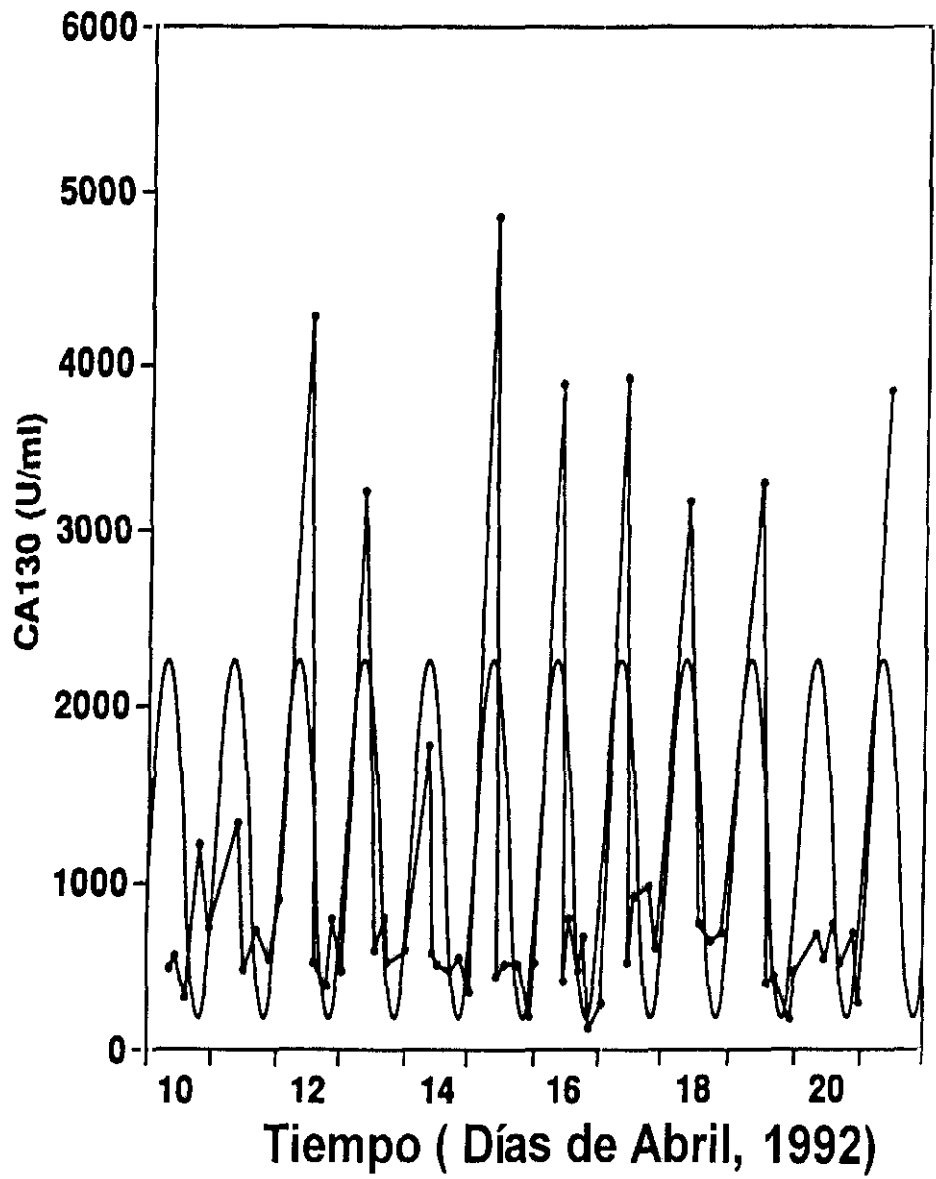
Amplitud = 854

No. Pts. = 23

Acrofase = -89° (05:57)

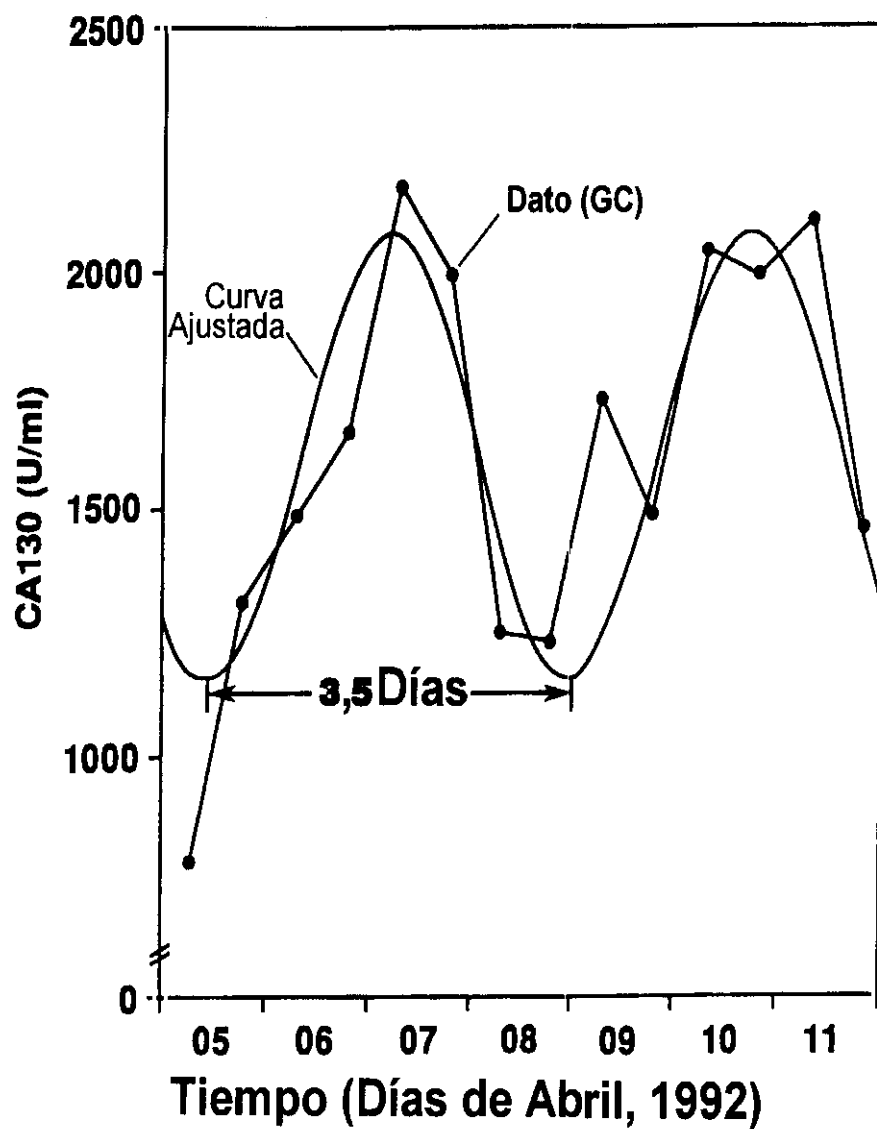
Gráfica 18

Ritmo circadiano del CA130



Periodo Ajustado = 24 horas Valor de P = <0,001
MESOR = 1195 Porcentaje Ritmo = 36
Amplitud = 1020 No. Pts. = 61
Acrofase = -92° (06:09)

Gráfica 19



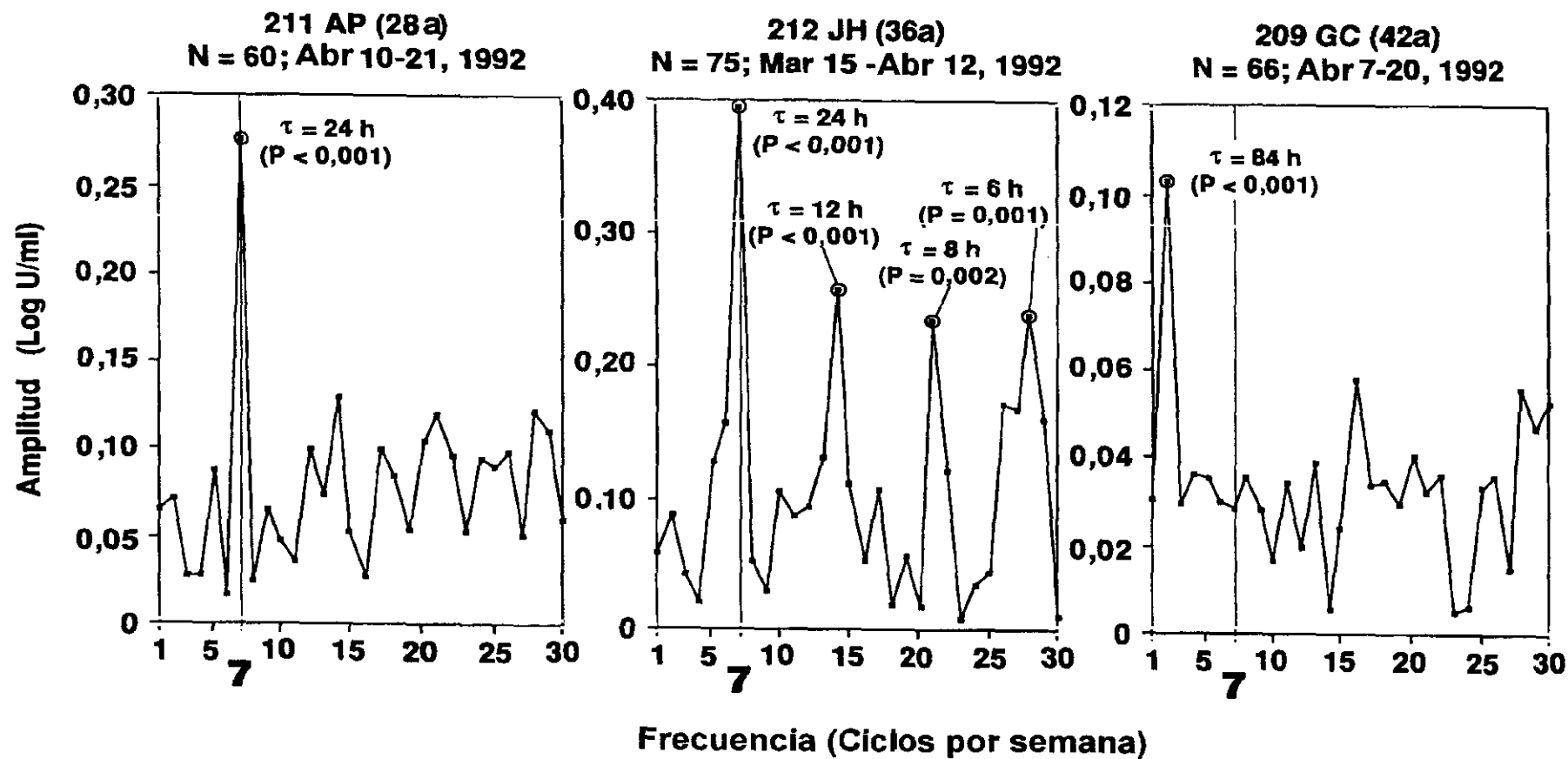
Periodo Ajustado= 84 h

MESOR = 1610 Valor de P = 0,001

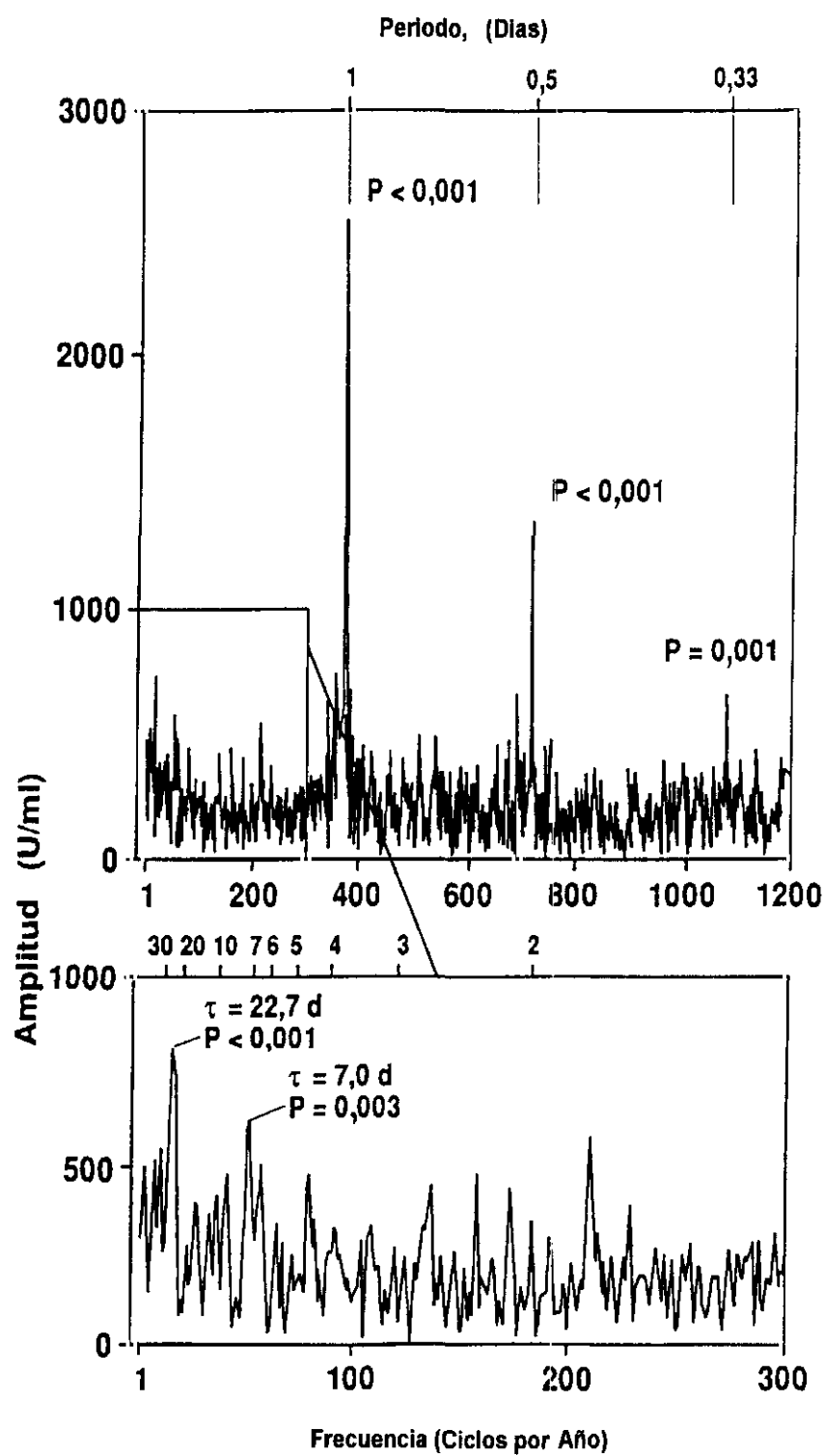
Amplitud = 455 Porcentaje Ritmo = 70

Acrofase = -224° N° Pts. = 14

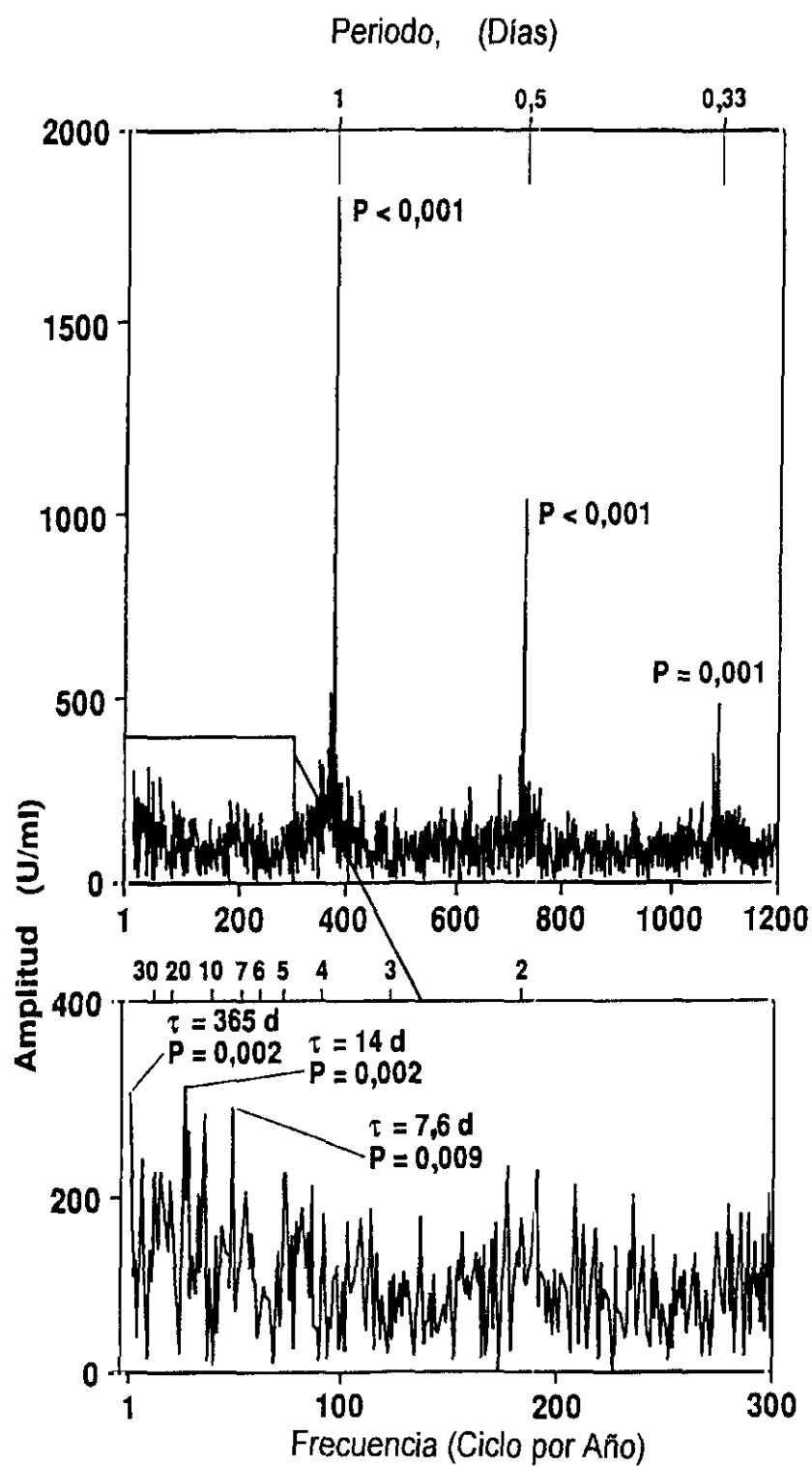
Gráfica 20



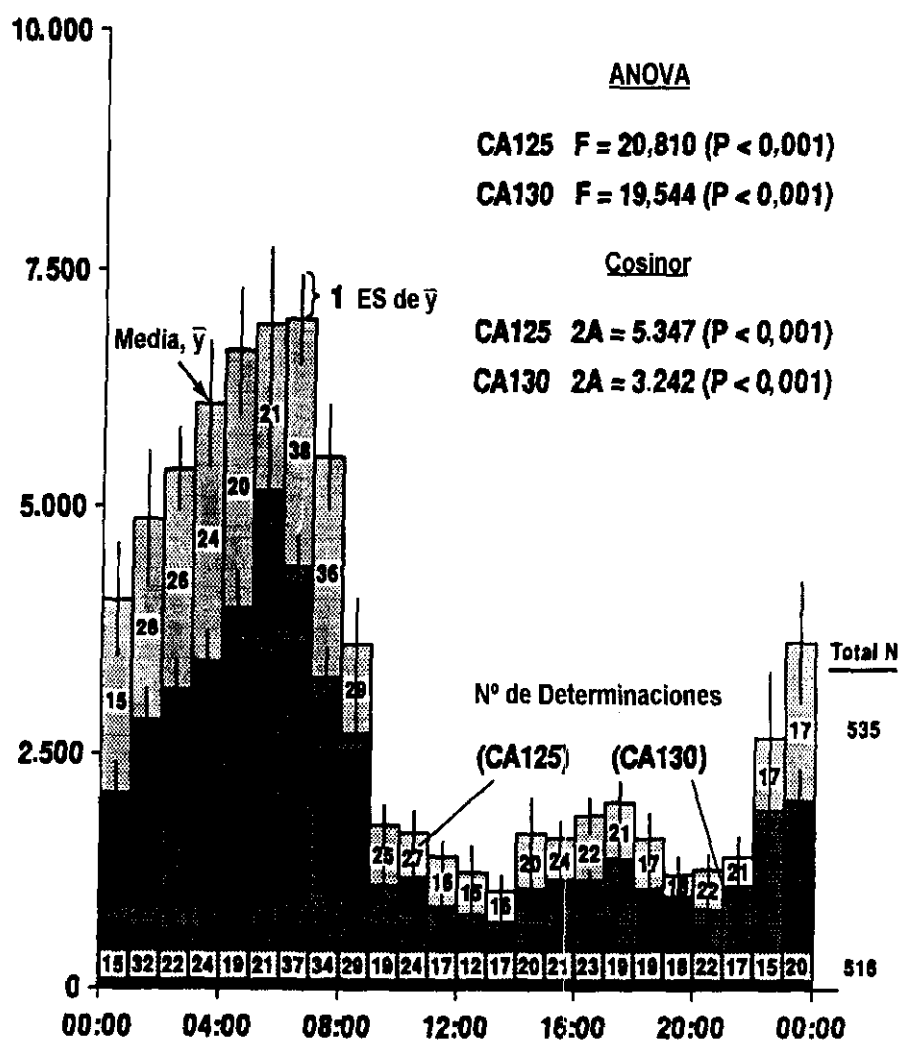
Gráfica 21



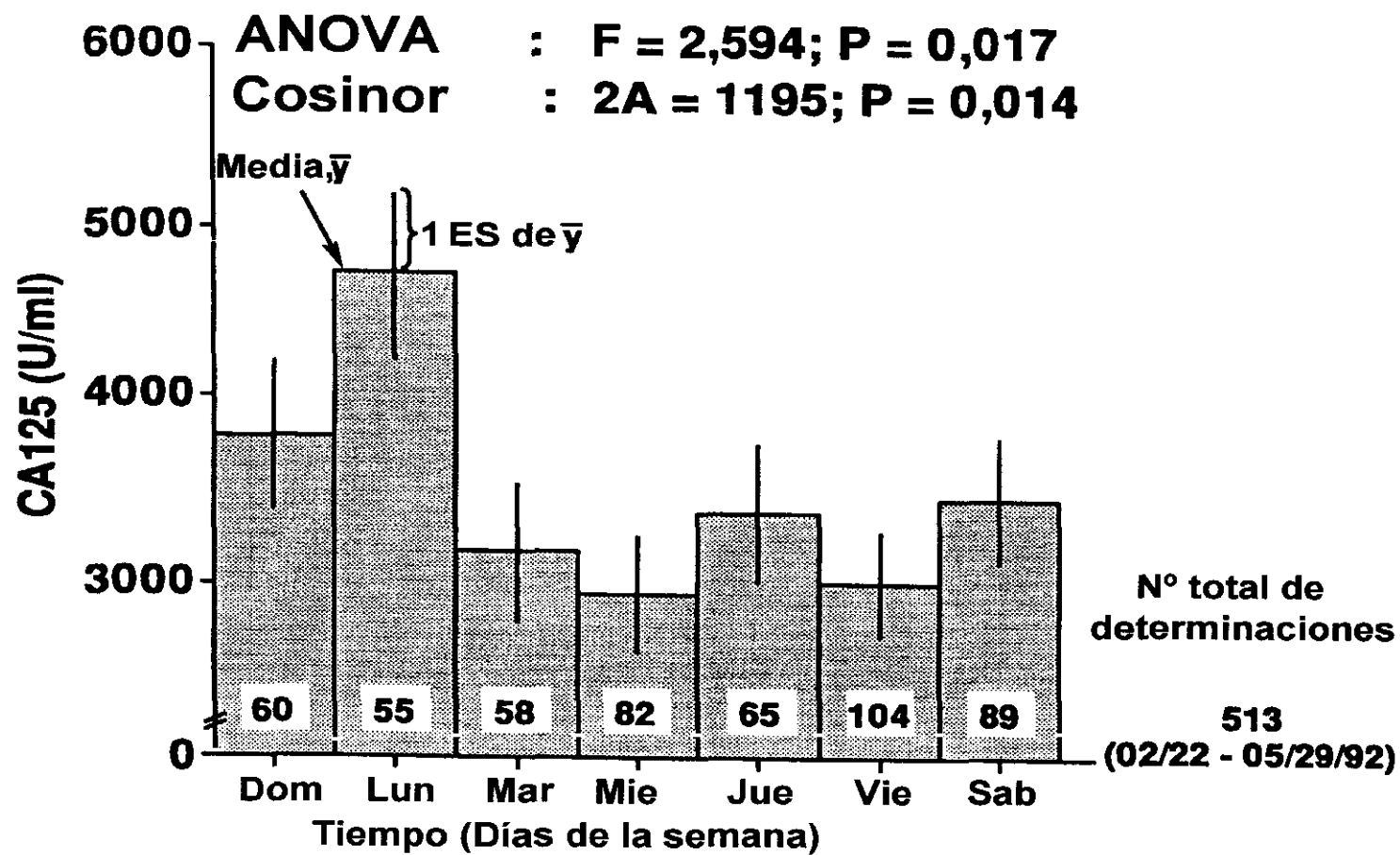
Gráfica 22



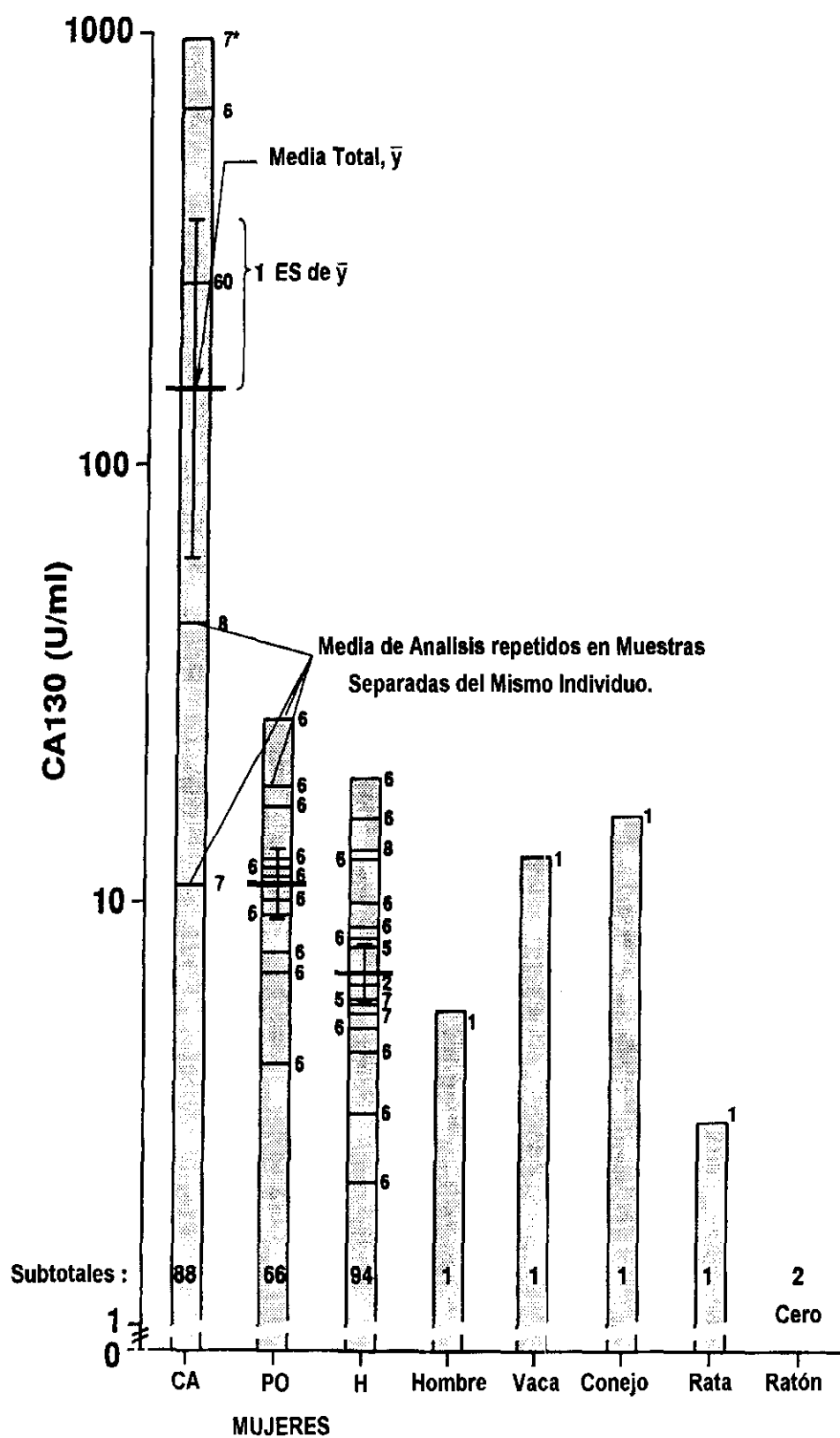
Gráfica 23



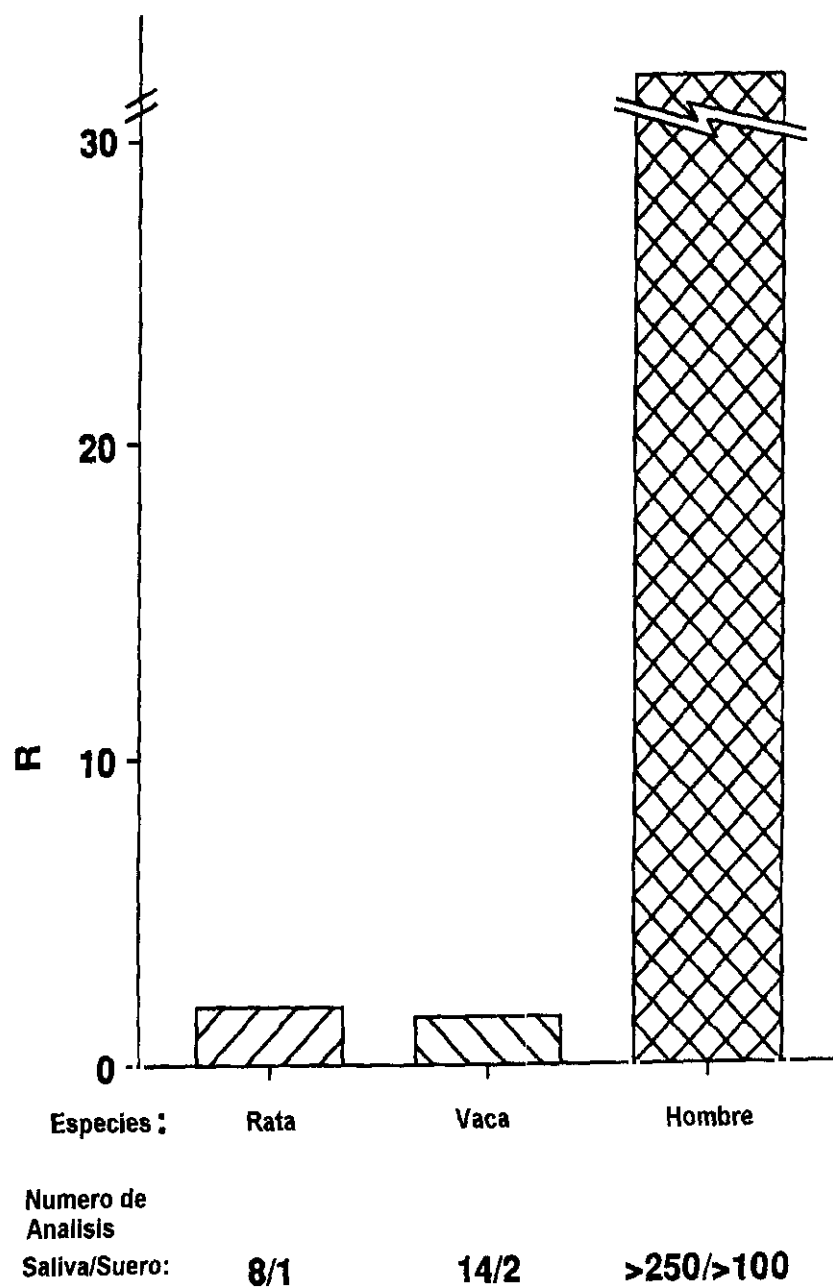
Gráfica 24



Gráfica 25



Gráfica 26



CC 10/92

Gráfica 27

EXPERIMENTO 3: ALOFASE CIRCATRIGINTANA ENTRE LA PRESION SANGUINEA Y LA FRECUENCIA CARDIACA

En la tabla 9, se resumen las características de los ritmos circadiano y circatrígintano (MESOR, amplitud y acrofase), acompañadas de sus límites de confianza del 95%. Todos éstos, calculados mediante el método cosenar, considerando para el ritmo circadiano los datos originales ($n = 8583$) y para el circatrígintano los 92 MESORes circadianos.

La tabla 10 muestra las características del componente circasemiseptano (3,5 días), que se aprecia en la frecuencia cardíaca, pero no en ninguna de las variables de la presión sanguínea (PAS, PAMy PAD).

La gráfica 28 obtenida mediante el método de los mínimos cuadrados, representa la evolución de la presión sanguínea sistólica, arterial media y diastólica, y de la frecuencia cardíaca, a lo largo de 3 meses aproximadamente; y muestra la curva coseno, de aproximadamente 720 horas (1 mes), que mejor se ajusta a los valores de la PS y FC, en este caso los MESORes que se obtienen de cada día (cada punto representa un MESOR circadiano, considerando intervalos de 24 horas que no se superponen). Las líneas verticales se corresponden con el comienzo de cada ciclo menstrual. El eje de ordenadas representa el tiempo (meses de 1992) y el eje de ordenadas la presión sanguínea (mm de Hg) y la frecuencia cardíaca (ppm).

El gráfico 29 nos proporciona una representación polar de los resultados anteriormente obtenidos en la gráfica 25. En la representación polar circadiana (derecha), se han empleado los datos de una semana. Se puede observar que se ha tomado como tiempo de referencia la medianoche local (00:00), por tanto $0^\circ = 00:00$ y $360^\circ \equiv 24$ horas. La banda oscura se corresponde con la duración de las horas de sueño. Las elipses de confianza (A, B, C y D), referentes a la PS y a la FC, están localizadas en la misma zona de la circunferencia polar, es decir sus acrofases ocurren aproximadamente a las mismas horas. Las elipses de confianza se superponen entre

sí, y al no encerrar el centro de la circunferencia, el ritmo es estadísticamente significativo.

Al observar la representación polar del ritmo circatrigintano, la circunferencia equivale a 720 horas y 0° al primer día de un ciclo menstrual; se puede ver la diferencia en grados entre las fases de la PS (A, B y C) y de la FC (D).

**TABLA 9: RELACIONES EN LA FASE CIRCADIANA Y CIRCATRIGINTANA
ENTRE LA PRESION SANGUINEA Y LA FRECUENCIA CARDIACA
EN UNA MUJER CLINICAMENTE SANA**

Variable	PR	p	MESOR \pm ES	2A \pm ES	ϕ (95 %IC)
Componente circadiano (datos originales; 17/04-28/07; n=8583)					
PAS	25,1	<0,001	107,0 \pm 0,1	19,4 \pm 0,4	-258°(-255, -260)
PAM	26,3	<0,001	82,0 \pm 0,1	18,8 \pm 0,4	-255°(-253, -257)
PAD	28,3	<0,001	63,9 \pm 0,1	15,0 \pm 0,2	-255°(-253, -257)
FC	22,1	<0,001	78,3 \pm 0,1	18,8 \pm 0,4	-247°(-245, -250)
Componente circatriginiano (periodo: 720 horas; 17/04-28/07; n=92)					
PAS	15,3	<0,001	107,0 \pm 0,4	4,8 \pm 1,2	-131°(-101, -160)
PAM	16,2	<0,001	82,9 \pm 0,3	4,0 \pm 1,0	-144°(-116, -172)
PAD	10,3	0,010	64,5 \pm 0,3	2,4 \pm 0,8	-170°(-132, -208)
FC	8,5	0,024	79,2 \pm 0,4	3,6 \pm 1,2	-292°(-245, -336)

PAS: Presión arterial sistólica

PAM: Presión arterial media

PAD: Presión arterial diastólica

FC: Frecuencia cardiaca

PR: Porcentaje del ritmo, proporción de la variación total calculada al ajustar el modelo

p: Valor p de un test de amplitud 0

2A: Doble amplitud

ϕ : Acrofase (360° = duración del periodo en horas o días; 0° = 00:00 del primer día de menstruación para los componentes circadiano y circatriginiano)

ES: Error standard

IC: Intervalo de confianza

El análisis circatriginiano fué realizado en los 92 MESORes circadianos

**TABLA 10: COMPONENTE DE APROXIMADAMENTE 3,5 DIAS
(CIRCASEMISEPTANO) EN LA FRECUENCIA CARDIACA DE UNA MUJER
CLINICAMENTE SANA**

Variable	PR	p	MESOR \pm ES	2A \pm ES	ϕ (95 %IC)
PAS	0,6	0,937	107,7 \pm 0,5	0,5 \pm 1,3	-139°
PAM	1,5	0,644	82,8 \pm 0,4	1,0 \pm 1,1	-162°
PAD	0,8	0,863	64,5 \pm 0,3	0,4 \pm 0,8	-106°
FC	10,3	0,010	79,2 \pm 0,4	3,9 \pm 1,3	-197°(-158, -237)

PAS: Presión arterial sistólica

PAM: Presión arterial media

PAD: Presión arterial diastólica

FC: Frecuencia cardiaca

PR: Porcentaje del ritmo, proporción de la variación total calculada al ajustar el modelo

p: Valor de p de un test de amplitud 0

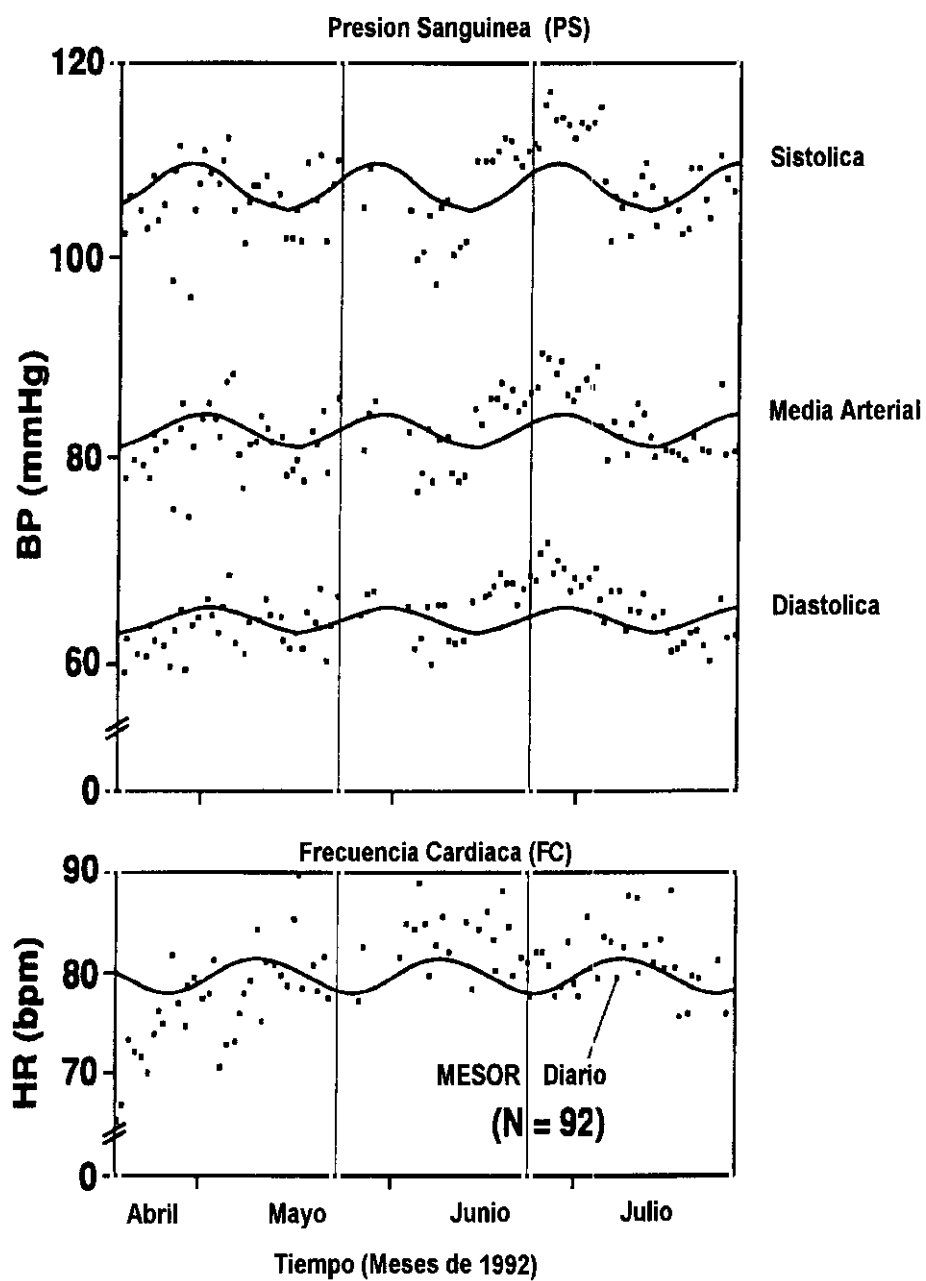
2A: Doble amplitud

ϕ : Acrofase (360° = duración en horas del periodo; 0° = 00:00 del 17 de Abril)

ES: Error standard

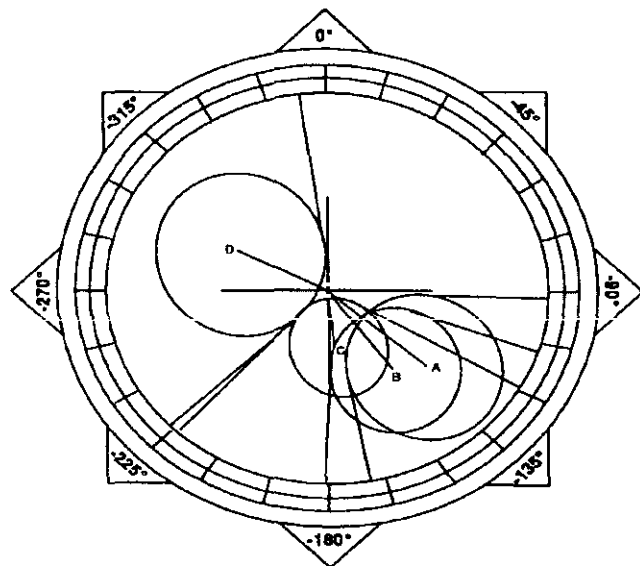
IC: Intervalo de confianza

El análisis circatrigintano fué realizado en los 92 MESORes circadianos



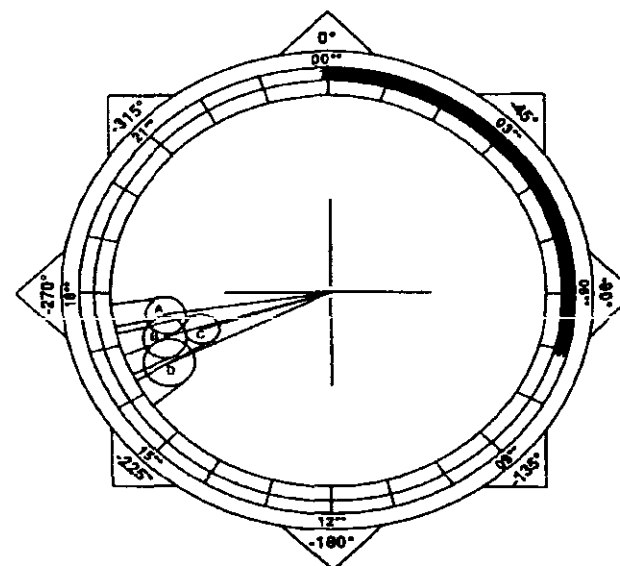
	<u>P</u>	<u>Acrofase, α (95% I.C.)*</u>
SBP	< 0,001	-131° (-92, -169)
MAP	< 0,001	-144° (-107, -180)
DBP	0,010	-170° (-118, -202)
HR	0,024	-292° (-226, -358)

Gráfica 28



Para θ en grados: $360^\circ \equiv 720$ días
 $0^\circ =$ Día 1 del ciclo

92 MESORs circadianos
 de intervalos de 24 horas
 no superpuestos



θ en grados: $360^\circ \equiv 24$ horas
 $0^\circ = 00:00$
 N° datos = 573
 Datos originales sobre
 intervalo de 1 semana

		Circatrigintano					Circadiano						
Identificación	P	PR	MESOR ± ES		Amplitud *		Acrofase (θ)*	PR	MESOR ± ES		Amplitud *		Acrofase (θ)*
A PAS	< 0.001	15	107.7	0.4	2.4 (0.9	3.9)	-131° (-92 -169)	37	105.4	0.4	10.8 (9.3	12.2)	-259° (-252 -267)
B PAM	< 0.001	16	82.9	0.3	2.0 (0.8	3.3)	-144° (-107 -180)	41	80.1	0.4	11.1 (9.7	12.5)	-252° (-245 -259)
C PAD	0.010	10	64.5	0.3	1.2 (0.2	2.7)	-170° (-118 -222)	42	61.8	0.3	8.8 (7.8	9.9)	-251° (-244 -258)
D FC	0.024	8	79.2	0.4	1.8 (0.2	3.4)	-292° (-226 -353)	33	70.3	0.5	11.7 (10.0	13.4)	-243° (-235 -252)

P = Probabilidad de la hipótesis: Amplitud=0; N=N° de observaciones

PR = Porcentaje del ritmo (porcentaje de variabilidad calculada por la curva coseno)

* 95% Límites de confianza (paréntesis) derivados de la elipse coseno

Gráfica 29

DISCUSSION

EXPERIMENTO 1:

VARIACION CIRCADIANA DEL CORTISOL

El mayor glucocorticoide, producido por la corteza adrenal de los conejos, es el cortisol; la relación entre corticosterona:cortisol es 1:20 (Ganjam *et al.*, 1972). Esta relación cambia hacia un exceso en la producción de cortisol bajo algunas circunstancias; una de estas es la acción de estímulos exógenos, como son, el manejo o las repetidas punciones venosas del sangrado serialmente dependiente (Singh *et al.*, 1975; Redgate *et al.*, 1981; Illera *et al.*, 1992).

El ritmo de los corticosteroides adrenales de los mamíferos, fue descrito, inespecíficamente, en los pioneros estudios de Pincus, y más tarde fue confirmada mediante el empleo de distintos protocolos por otros autores, como Ganjam *et al.* (1972), Singh *et al.* (1975) y Sowers *et al.* (1981). Asimismo fue estudiada en diferentes especies de laboratorio y principalmente en la especie humana por Halberg (1964), Weitzman *et al.* (1971), Aschoff (1979), Dalle *et al.* (1980), Fujieda *et al.* (1982) y Garris (1986). Pero, pese a esto, la mayoría de las citas consultadas suelen referirse a la existencia de un gran margen que oscila entre 0,6 y 5,8 ng/dl (Depaolo y Masoro, 1989) y citan que por las mañanas los valores son más altos. Como podemos comprobar, nuestros valores de los conejos sangrados de forma serialmente independiente, se encuentran dentro de este amplio margen, no ocurriendo lo mismo con los conejos sangrados de forma serialmente dependiente. Estos presentan algunos valores que se salen fuera del mismo margen. Al indicar, estos autores, que por la mañana presentan valores más altos, se nos presenta la duda de, si es por la mañana nuestra (es decir podrían ser las 6:00, las 7:00, las 8:00, las 9:00 h) siendo este margen bastante amplio (dependiendo de la persona que recoja la muestra); o bien si es la mañana del conejo, que se corresponde con nuestra noche, pues, como es de todos conocido, los conejos (*Oryctolagus cuniculus*) son animales nocturnos al igual que ratas y ratones, y además la mañana de los conejos dependería de cuándo se enciende la luz en cada animalario.

Halberg *et al.* (1981) realizaron estudios sobre el cortisol plasmático en mujeres clínicamente sanas, describiendo una forma de la curva circadiana del cortisol, que presentaba un pico principal por las mañanas y un segundo pico por las tardes. Nuestros resultados confirman la existencia de estos dos picos, como queda reflejado en la tabla 2, en la que podemos ver como, tanto el componente de 24 horas como el de 12 horas, son significativos estadísticamente; y al considerarlos de forma conjunta obtenemos un valor $p < 0,001$, tanto para los conejos sangrados SD y SI, lo que significa la aceptación de la existencia de un ritmo circadiano con un componente circasemidiano que influye en la forma de la curva, de forma estadísticamente significativa.

Ritmo circadiano en el cortisol plasmático de los conejos.

Los datos del cortisol, de todos los conejos, fueron analizados mediante el empleo del método cosenior simple, en un ciclo de luz dado y de acuerdo con un esquema de obtención de muestras determinado, revelando un ritmo circadiano estadísticamente significativo en todos los casos, bajo todos los ciclos de luz:oscuridad (LO) del estudio serialmente dependiente (SD) con una significación de $p < 0,001$; en el experimento serialmente independiente (SI), los ciclos LO 14:10, LO 16:08 y LO 10:14 mostraban una significación estadística con una $p < 0,001$ y, sin embargo, bajo LO 12:12, la $p = 0,002$, y bajo 08:16, la $p = 0,003$ (tabla 1).

El ajuste de un modelo compuesto por dos componentes, con periodos de 24 y de 12 horas, mediante el método de los mínimos cuadrados, indica que ambos son estadísticamente significativos ($p < 0,001$) para los animales alojados en los 5 diferentes fotoperiodos, tanto en el caso de que las muestras se obtuviesen de forma serialmente dependiente, como independiente (tabla 2).

El componente circasemidiano contribuye, de forma estadísticamente significativa, a la forma de la curva del ritmo circadiano del cortisol de los conejos ($p < 0,001$, salvo en el régimen LO 10:14 del grupo SI, $p = 0,029$). La prominencia relativa de estos dos componentes, circadiano y circasemidiano, va a diferir entre

conejos sangrados de forma serialmente dependiente, y aquellos sangrados de forma serialmente independiente; mientras que para los primeros el componente de 24 horas es más prominente que el componente de 12 horas, para los segundos el componente circasemidiano es más notable o de la misma magnitud que el circadiano. Un análisis coseno de medias de población, aplicado a las características (M, A, ϕ , PR) del ritmo del cortisol de los conejos bajo los diferentes ciclos de luz, revela un ritmo circadiano y circasemidiano de población estadísticamente significativo, en los conejos sangrados de forma SD ($\tau = 24\text{h}$: $p = 0,019$ y $\tau = 12\text{ h}$: $p = 0,028$), pero no para los sangrados SI, aunque su componente de 12 horas es casi significativa, ($p = 0,079$) (tabla 2). Estos resultados indican, que las características del ritmo circadiano del cortisol son diferentes, dependiendo de la forma de extraer las muestras sanguíneas en los animales.

Obtención de muestras de forma serialmente dependiente (SD) o serialmente independiente (SI).

Los MESORes, amplitudes y acrofases del ritmo circadiano del cortisol se compararon entre los conejos sangrados SD y SI, de forma separada para cada ciclo de luz (tabla 1).

De forma global, existe una gran diferencia en cuanto al MESOR del cortisol, los conejos sangrados SI tienen menor concentración de cortisol, que los sangrados SD ($p < 0,001$, en todos los ciclos de luz), por tanto presentan MESORes menores.

Se aprecia también una diferencia en la amplitud circadiana, los conejos sangrados SI tienen una menor amplitud si los comparamos con los conejos sangrados SD ($p < 0,001$ para los conejos bajo ciclos de LO 12:12, LO 14:10 y LO 16:08; $p = 0,068$ para aquellos bajo un ciclo de LO 10:14 y $p = 0,092$ para los conejos alojados en LO 08:16). Como se puede ver en las gráficas 1-5; unas altas concentraciones de cortisol, y una gran amplitud circadiana, caracterizan a los conejos sangrados de forma serialmente dependiente, en relación con aquellos sangrados de forma independiente.

Al comparar los valores del MESOR del cortisol de los conejos sangrados SD y SI, por parejas, mediante el t-test, aparece una diferencia de $3,2 \pm 0,6$ ng/ml ($t=5,421$; $p= 0,006$). Para la amplitud circadiana se encuentra una diferencia similar, siendo esta de $3,2 \pm 0,9$ ng/ml ($t=3,671$; $p= 0,021$). Sin embargo, cuando expresamos la amplitud en relación al MESOR, la diferencia ($25,1 \pm 13,2\%$) no es significativa, aunque está casi en el límite ($t=1,902$; $p= 0,130$).

En LO 10:14 y en LO 08:16, es decir, en ciclos de luz con una fotofracción menor de 12 horas, la amplitud circadiana relativa (A/M), del ritmo del cortisol fue estadísticamente diferente, aunque no de forma significativa, siendo mayor en los conejos SI que en los SD; sin embargo, cuando las amplitudes están expresadas en unidades originales sucede lo contrario (tabla 1).

En resumen, se observa un ritmo con aproximadamente el mismo periodo en cada ciclo de luz, y en ambos métodos de obtención de muestras (SD y SI). El sangrado SI está asociado con un MESOR y una amplitud circadiana del cortisol menores, si los comparamos con los sangrados SD.

Relación entre la amplitud circadiana del cortisol y la duración del periodo de luz.

En los conejos sangrados SD se observa, que la regresión lineal de la amplitud circadiana con la duración de la fotofracción del ciclo de luz, es estadísticamente significativa ($R=0,642$; $p= 0,005$), gráfica 8. Estos resultados provienen de los análisis individuales, en los que cada conejo provee una estimación individual de la amplitud. En los conejos sangrados de forma SI, no se encuentra una relación similar entre la amplitud circadiana del ritmo del cortisol y la fotofracción del régimen de luz.

Estos resultados a la vez son interesantes porque, en mujeres clínicamente sanas, se vió que la amplitud circadiana del cortisol es mayor en primavera y verano (más horas de luz), que en otoño e invierno. Esta diferencia se hace mayor incluso, si comparamos únicamente verano e invierno (tabla 3).

Comparación entre los diferentes regímenes de luz.

Muestreo serialmente dependiente.

Aunque las comparaciones se hayan hecho, tanto en base a series simples como en base a procedimientos del método cosenior de medias de poblaciones, se encontraron los siguientes resultados:

El MESOR del cortisol es mayor en los conejos alojados en un ciclo de LO 12:12, que en aquellos alojados en otros ciclos ($p < 0,050$) y el MESOR del cortisol de los conejos mantenidos en un régimen de LO 08:16, es menor que el de los alojados en el resto de los ciclos ($p < 0,001$).

La amplitud circadiana del cortisol de los conejos sometidos a los ciclos LO 10:14 y LO 08:16, es menor que la amplitud de los conejos alojados en otros ciclos ($p < 0,020$). La amplitud, en los conejos con LO 08:16 es ligeramente menor que con LO 10:14 ($p = 0,018$, mediante el test de poblaciones). Cuando se expresa la amplitud circadiana en relación al MESOR (% del MESOR), esta sigue siendo mayor en los conejos alojados en LO 14:10 que en los conejos alojados bajo otros ciclos ($p < 0,050$, excepto para LO 16:08).

La acrofase circadiana del cortisol de los conejos en LO 12:12 ocurre más tarde ($p < 0,020$, mediante el test de poblaciones), mientras que la acrofase del cortisol en los conejos mantenidos en LO 14:10 ocurre más temprano ($p < 0,050$) que la de los conejos alojados en otros regímenes.

Muestreo serialmente independiente.

Con este tipo de muestreo el MESOR del cortisol de los conejos, en LO 10:14, es mayor que el de los conejos en LO 12:12 ($p = 0,035$), el cual es, a su vez, mayor que el MESOR de los conejos sometidos a otros regímenes de luz ($p < 0,010$).

En los conejos del ciclo LO 10:14 se observa una amplitud circadiana algo mayor ($p < 0,050$), con respecto a los demás (excepto para LO 08:16). Cuando la amplitud se expresa en relación al MESOR, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes regímenes de luz.

Las diferencias en la acrofase circadiana del cortisol, no son constantes entre los conejos sangrados de forma SD o SI. Los intervalos de confianza para los conejos sangrados SI, bajo diferentes ciclos de LO, no se solapan (figura 3). Por lo que se refiere a la dispersión de las acrofases del ritmo circadiano, en los diferentes regímenes de luz de los conejos sangrados de forma SD (gráfica 9), ésta es mucho menor si la comparamos con la dispersión que existe en las acrofases de un régimen de luz a otro en los conejos SI (gráfica 10), aunque se elija como tiempo de referencia HAML u otros tiempos (HALO, HADO o HAMD). Existe la posibilidad de que los animales, alojados bajo diferentes regímenes de luz, fueran estudiados en una etapa diferente de otro ritmo biológico, como puede ser el circanual, el cual puede haber contribuido en las diferencias en acrofase. Esto se podría explicar en posteriores estudios, al confirmar una modulación circanual de las características circadianas, en conejos sangrados sistemáticamente en diferentes regímenes de luz, para comprobar cambios concomitantes a lo largo de la escala circadiana, circaseptana (Uezono *et al.*, 1984) y circanual. La existencia de estas variaciones circanuales en el cortisol de un grupo de mujeres fue estudiada por Halberg (1991) y queda reflejado en la tabla 3.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran la existencia del ritmo circadiano del cortisol plasmático en conejos NZW machos, sin que tenga influencia, en este ritmo endógeno, la forma de obtención de las muestras. También se demuestran y cuantifican los parámetros del ciclo adrenocortical en los conejos, tanto en los sangrados serialmente dependiente como en los serialmente independiente. Hallazgos similares fueron descritos en ratones (Halberg y Visscher, 1950, 1952; Halberg *et al.*, 1958, 1959)) utilizando como parámetro a estudiar los eosinófilos, y en ratas por Glick *et al.* (1961); en estos casos, la relación corticosterona:cortisol es inversa a la del conejo, puesto que en estos animales el mayor glucocorticoide producido por la corteza adrenal, no es el cortisol, sino la corticosterona.

Una vez demostrada la existencia del ritmo circadiano del cortisol, comprobamos la influencia del fotoperiodo (tanto de la fotofracción como de la escotofracción) en las concentraciones de cortisol plasmático, dependiendo del tipo de sangrado (SD y/o SI). La amplificación del ritmo circadiano, mediante regímenes de luz con una mayor fotofracción, puede deberse, en parte, a una hiperproducción de cortisol por parte de la corteza adrenal estimulada por el efecto de la luz, como queda reflejado en la gráfica 8, en el que podemos observar la existencia de una correlación positiva ($R=0,642$) entre la duración de las horas de luz y la amplitud del cortisol ($p < 0,001$). Aunque anteriormente se llevaron a cabo estudios sobre este tema, en diferentes especies de laboratorio y en seres humanos (Nichols y Tyler, 1967; Nichols y Chevins, 1981; Fujieda *et al.*, 1982; Haen *et al.*, 1984; Garris, 1986), se encuentran muy pocos trabajos de la influencia de los ciclos de luz-oscuridad en las concentraciones de cortisol plasmático en los conejos (Sothorn *et al.*, 1978; Sothorn y Halberg, 1979). Observamos que a mayor duración de la fotofracción más pronunciado es el ritmo circadiano, produciéndose el pico de las concentraciones plasmáticas de cortisol antes del inicio del periodo de oscuridad y la gran influencia del periodo de luz en el descenso de los dos picos de cortisol discutidos anteriormente.

Haciendo un breve resumen de lo tratado anteriormente podemos decir, que se demuestra la existencia del ritmo circadiano del cortisol, con participación del componente circasemidiano en la forma de la curva, sobre todo en los conejos sangrados de forma serialmente independiente. Estos a su vez presentan menores MESORes y amplitudes que los sangrados de forma serialmente dependiente, lo que nos indica una mayor síntesis o liberación del cortisol ante determinados estímulos. También estudiamos la influencia de la luz en el ritmo del cortisol, comprobando que en los animales que sangrabamos de forma dependiente, cuanto mayor era la duración de la fotofracción, mayor era la amplitud; produciéndose las acrofases antes del periodo de oscuridad.

Todo ello nos conduce a tener en cuenta, y utilizar, los diseños cronobiológicos a la hora de investigar cualquier variable fisiológica, puesto que el conocer los ritmos biológicos (en este caso sincronizados por el régimen de luz) de muchas de las

características de los animales de laboratorio, puede ayudarnos a reducir la gran variabilidad de las mediciones cuantitativas en los mismos (Wollnik, 1989).

Cuando analizamos los 23 datos de los dos marcadores de crecimiento, CA125 y CA130 (transformados en logaritmos) procedentes de una mujer clínicamente sana, mediante un análisis de varianza de un sentido, se muestra un efecto del tiempo, estadísticamente significativo, (CA125: $F = 3,149$; $p = 0,034$), (CA130: $F = 3,081$; $p = 0,037$) (gráfica 15). Cuando los análisis se llevan a cabo en los datos expresados en unidades originales, el efecto del tiempo es casi estadísticamente significativo (CA125: $F = 2,395$; $p = 0,081$) (CA130: $F = 2,230$; $p = 0,099$) (gráfica 16); encontrándose también una significación estadística dudosa para el componente circadiano, al analizar los 23 datos mediante el método cosenior simple (gráficos 15 y 16). Una vez que disponemos de más datos, como en el caso del CA130, determinado en las 61 muestras recogidas entre el 10 y el 21 de Abril, los resultados son estadísticamente significativos ($p < 0,001$) tanto mediante ANOVA, como mediante el método cosenior simple ($p < 0,001$) (gráficos 17 y 18).

Para la obtención de estos gráficos, los datos fueron agrupados unos con otros, en unas 24 horas "ideales" y asignados a 6 clases diferentes de 4 horas, de acuerdo con la hora del día. Cuando se comparan las variaciones circadianas del CA125 y del CA130, se puede observar que entre las 04:00 y las 08:00 horas, y en menor medida entre las 08:00 y las 12:00 horas, tanto el CA125 como el CA130 están aumentados, al compararlos con los valores del resto de las horas.

El ritmo circadiano de los marcadores de crecimiento CA125 y CA130 encontrado en esta persona sana, se parece al encontrado en una paciente con cáncer de ovario (EH) (Cornélissen *et al.*, 1991), si bien con una amplitud circadiana menor y un considerable menor MESOR en la primera. En las gráficas 12 y 13 se pueden observar estas diferencias, estadísticamente significativas, entre los MESORes de sujetos sanos y con cáncer, tanto cuando se calcula en valores originales ($t = 2,837$,

$p=0,013$) como en valores transformados en logaritmos ($t=3,384$, $p=0,004$).

Anteriormente citamos la existencia de un ritmo circadiano, en ambos marcadores de crecimiento, demostrándolo tanto mediante análisis de varianza como mediante el método cosenor (gráficas 14 a 17 y tabla 5). Cuando representamos la curva coseno que mejor se adapta a los 23 datos de CA125 (gráfica 18) y la que mejor se adapta a los 61 datos del CA130 (de AP), mediante el método lineal de los mínimos cuadrados, obtenemos dos curvas circadianas de iguales características a las encontradas anteriormente.

Se puede apreciar, de forma casi invariable, que el pico de la concentración salivar de CA130 ocurre por las mañanas. Pero cuando tratamos de ajustar una curva coseno, a los 14 datos del marcador de crecimiento CA130, de otro sujeto (GC), la curva que mejor se adapta es una circasemiseptana, Esto quizá esté en relación con una histerectomía sufrida unos años antes (gráfica 20). Estos ritmos están representados como espectros de frecuencia en el gráfico 21, donde se aprecia cómo sobresalen los ritmos predominantes de entre los demás.

La tabla 4 es un resumen estadístico de las 23 muestras de CA125 y de CA130 de una persona clínicamente sana, expresados en unidades originales y después de su transformación en logaritmos, antes y después del enjuagado de la boca. En ella están reflejados: la media, su error estándar, el valor mínimo y el máximo, y la mediana de cada variable. El CA125 presenta mayores concentraciones que CA130, cuando se recoge la saliva antes del enjuagado de la boca; pero cuando estas determinaciones se llevan a cabo en muestras recogidas después del enjuagado, encontramos que las concentraciones de CA130 son ligeramente superiores, que las de CA125.

De nuevo, al observar detalladamente cómo varían las concentraciones de los dos marcadores a lo largo del día (tabla 5), observamos que los valores totales o los MESORes en las series de 23 y en las de 61 datos, el marcador de crecimiento CA125 es, en general, mayor que el CA130, en los datos originales y en los transformados en logaritmos, al dividir las concentraciones según el momento circadiano.

Si comparamos las medias del CA125 y del CA130, antes y después del enjuagado de la boca, de AP, con los de otro sujeto sano (GC), se obtienen unas diferencias estadísticamente significativas, tanto para el CA125 (AP, $p = 0,003$; GC, $p < 0,001$), como para el CA130 (AP, $p = 0,007$; GC, $p < 0,001$) (gráfica 11). Por tanto, las concentraciones de los marcadores de crecimiento son mayores antes de enjuagarse la boca que después.

Otro hecho a destacar, es que encontramos que las concentraciones de CA130 eran menores que las de CA125, esto es opuesto a lo publicado por Kobayashi *et al.* (1991), dichos autores determinaron ambos marcadores en diferentes tejidos, así como en fluidos, como amnios, corion, placenta y líquido amniótico, para estudiar la relación existente entre el CA125 y el CA130. El coeficiente de correlación (de 0,987) entre los dos marcadores, dado por estos autores, se obtiene en asociación a la recta de regresión:

$$Y = 377,7 + 0,969X$$

dónde Y representa la concentración del CA130 en U/ml y X representa la concentración de CA125, también en U/ml. Cuando usamos esta ecuación para deducir los valores relativos de los dos marcadores, se esperaría que el CA130 tuviese concentraciones más altas que el CA125, pero nuestros resultados indicaban lo contrario.

Resultó entonces interesante investigar otras series temporales, para comprobar si el CA130 era menor que el CA125 salivares, de forma consistente, o bien las diferencias encontradas se debían a una mera variación interindividual. Al comprobarlo, con otros sujetos, se encontró que el CA130 era consistentemente menor que el CA125, tanto en saliva recogida sin estimular, como en la recogida después del enjuagado de la boca, como queda reflejado en la tabla 6; únicamente en el caso de AP, cuando se recoge la saliva después de enjuagarse la boca, el CA130 es ligeramente más alto que el CA125.

Al analizar las concentraciones por espacios de tiempo, se encontró que la diferencia entre estos dos marcadores es mayor, cuando las concentraciones son más altas durante la noche y menor cuando las concentraciones son más pequeñas (tabla 7). Al comprobar si las diferencias estaban en función de las concentraciones de los marcadores, vemos que de nuevo el CA130 es consistentemente menor que el CA125 (tabla 8).

Se compararon entre sí los marcadores CA130 y CA125 séricos de la misma paciente con cáncer de ovario, y comprobamos que la diferencia de 238 ± 47 U/ml era estadísticamente significativa en una prueba (test) t por parejas ($t=5,082$; $p=0,001$) y guardan relación con los resultados obtenidos en la saliva.

Podemos asumir, que el CA130, tanto de sujetos sanos como con cáncer, tiene menores concentraciones al compararlo con el CA125 y estos dos presentan un ritmo circadiano con similares características entre sí, y con los de una paciente con adenocarcinoma que envuelve el ovario. Esta prominente variación circadiana, que caracteriza ambos marcadores, se debe tener en cuenta a la hora de establecer los críticos momentos de recogida de muestras, tanto sanguíneas como de saliva, especificados en el tiempo, así como al instaurar un tratamiento terapéutico, para determinar en que momento exacto del día se deben administrar los fármacos (Halberg, 1983).

Chen *et al.*, en 1990 propusieron un valor límite de 3000 U/ml para el CA125 salivar, recogido por la mañana y después de un cuidadoso enjuagado de boca. Esta estipulación, usar el valor de la mañana después del enjuagado, es un paso en la dirección correcta. Aunque, si se refiriese al momento de levantarse, sería una especificación en el tiempo más precisa, y reduciría ciertas dudas relacionadas con el momento de acostarse; por ejemplo, en un trabajador con cambio de turno de trabajo. Esta consideración sólo tendría sentido, cuando las determinaciones se hiciesen en las muestras recogidas en el momento de levantarse, pues si lo hiciésemos en muestras recogidas sobre la 13:00 horas, no detectaríamos ningún paciente con cáncer, y es cuando las concentraciones de los marcadores de crecimiento son mínimas. Aunque

queda demostrado que los MESORes de CA125 y de CA130 son mayores en pacientes con tumores, que en individuos sanos.

Aparte de todo lo citado con anterioridad sobre el ritmo circadiano de los marcadores de crecimiento, éstos quedan patentes en los espectros de frecuencia (gráficas 22 y 23), en los que, aparte del ritmo circadiano ($p < 0,001$), podemos observar el resto de los componentes de cada cronoma: el CA125 tiene además un componente circaseptano ($p = 0,003$) y circavigintano ($p < 0,001$), en el CA130 no se observan estos componentes, sino un circanual y uno circadisepiano ($p = 0,002$, para ambos) y un componente de 7,6 días ($p = 0,009$), pero no de 7 días. Hasta ahora se conocen escasos cronomas completos, el más estudiado ha sido el de la presión sanguínea y el de la frecuencia cardíaca, encontrando en éstos un componente circadiano (el más estudiado), ultradianos y también infradianos, pero ésta es la primera descripción detallada de los distintos componentes del cronoma de los marcadores de crecimiento CA125 y CA130, anteriormente había sido descrito con más detalle sólo el circadiano (Halberg *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992)

Tras determinar los componentes del cronoma de ambos marcadores, quisimos estudiar con mayor precisión, el componente circadiano y para ello representamos los datos del CA125 y del CA130 (EH) en un plexograma circadiano de 24 clases. Estos plexogramas nos dan una aproximación de la evolución de dichos marcadores, a lo largo del día, así como de las concentraciones aproximadas en cada hora (clase), gráfica 24. Los valores máximos se producen entre las 06:00 y las 07:00 horas, como se ha descrito anteriormente para las 23 muestras de saliva de un sujeto clínicamente sano (AP), cuyos máximos valores se alcanzaban entre las 04:00 y las 08:00 h, al ser las clases de 4 horas. Observamos que ambos marcadores presentan un ritmo circadiano muy similar, demostrado estadísticamente, tanto mediante ANOVA como por el método cosenar (CA125: $F = 20,810$, $2A = 5347$, $p < 0,001$ y CA130: $F = 19,544$, $2A = 3242$, $p < 0,001$)

En resumen, de todos los análisis macroscópicos y microscópicos anteriores, se deduce que, los marcadores de crecimiento, CA125 y CA130, tanto de sujetos sanos

como de pacientes con tumores ováricos, presentan un ritmo circadiano de gran amplitud y que siguen patrones similares, cuya acrofase se localiza entre -60° y -80° , aunque con diferencias en cuanto a amplitud y MESOR.

El componente circaseptano del CA125, que junto con el circadiano caracteriza el cronoma de EH, se puede observar representado mediante un plexograma en la gráfica 25, en el que, los mayores valores predecibles se producen los lunes. Este ritmo es detectado cuando los datos se analizan mediante el método cosenior ($2A=1195$; $p=0,017$), y mediante el análisis de varianza, empleado en el plexograma ($F=2,594$; $p=0,017$).

Estos marcadores de crecimiento, hasta ahora considerados como marcadores tumorales del crecimiento de tumores relacionados con el aparato reproductor de las mujeres, han sido determinados también en el suero de un hombre y en diferentes especies animales (sanos), tanto en saliva como en suero (excepto en el ratón) (gráfica 26). Por tanto no son exclusivos de la mujer, tampoco del género humano y no deberían denominarse marcadores tumorales, sino marcadores de crecimiento.

De los resultados obtenidos en animales, y en los seres humanos, se puede apreciar que las concentraciones de CA125 y CA130 salivares están correlacionadas de forma positiva con las séricas; en la especie humana, son mucho más altas en el primer fluido que en el segundo, siendo la relación saliva/suero > 30 , en personas sanas; la relación encontrada en ratas fue de 1,76, resultados basados en 3 muestras de suero frente a 8 de saliva y la relación hallada en vacas es de 1,58 (basado en 14 muestras de saliva frente a 2 de suero).

Pero, en la actualidad, es muy difícil de explicar por qué en un individuo aparentemente sano, el CA130 no presenta un ritmo circadiano ($p=0,442$) sino que éste es reemplazado por ritmo de 3,5 días o circasemiseptano ($p<0,001$), quizá esto esté relacionado con la histerectomía sufrida 8 años antes. Tampoco existe, en la actualidad, una posible explicación de por qué el CA125 de una paciente con cáncer presenta un ritmo de 7 días exacto ($p=0,003$), mientras que el CA130 muestra un ritmo, estadísticamente significativo, con un periodo que difiere de los 7 días exactos

($\tau=7,6$; $p=0,009$). Algún día esperamos poder encontrar la solución a todas estas dudas y a otras muchas de las que se plantean actualmente, como es la posible prevención de esta enfermedad o, si ésta no es posible, una temprana detección del cáncer, mediante el control de algunos de los parámetros empleados en la cronobiología.

EXPERIMENTO 3:

ALOFASE CIRCATRIGINTANA ENTRE PRESION SANGUINEA Y FRECUENCIA CARDIACA

Anteriormente hablábamos de la posible prevención de algunas enfermedades como el cáncer; otras de las enfermedades "actuales" son las relacionadas con el corazón y con la presión sanguínea; por eso cuanto más podamos conocer acerca de estas variables antes podremos dar una solución a estos problemas y evitar al mismo tiempo fallos humanos, como los cometidos al administrar un fármaco que disminuye la tensión a pacientes diagnosticados como hipertensos, y que realmente no lo son, únicamente porque fueron al médico, a medirse la presión sanguínea durante la consulta de la tarde (cuando la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca presentan sus valores máximos) (Cornélissen et al., 1990).

Ambas variables (PS y FC) presentan un ritmo circadiano, ($p < 0,0010$), y se encuentran sincronizadas en fase (isofase), a lo largo de la escala circadiana; es decir, se puede considerar que a lo largo de la escala circadiana del tiempo, tanto la PS como la FC presentan sus máximos valores, aproximadamente a las mismas horas, entre las 17:00 y las 18:00 horas (tabla 8); por ejemplo, los valores de la FC en un día pueden oscilar, desde unos valores mínimos predecibles (batifase) de 60 pulsaciones por minuto (ppm) a las 6:00 de la madrugada, hasta unos valores máximos predecibles o acrofase de 97 ppm a las 18:00 horas, sin que ello presuponga peligro alguno para la salud.

Este ritmo circadiano fue demostrado, mediante el método cosenar, por Halberg (Halberg *et al.*, 1980; Halberg *et al.*, 1988), y ampliamente estudiado por él y el grupo internacional que con él colabora (Cornélissen *et al.*, 1992; Kumagai *et al.*, 1992; Wrbsky *et al.*, 1992), demostrando la existencia de éste y de otros ritmos, en cientos de personas; este ritmo está amplia y detalladamente reflejado en esta investigación.

Con las evidencias que nos proporcionan los resultados (gráficas 28 y 29), sirven para confirmar la afirmación de que la frecuencia cardiaca (FC) y la presión

sanguínea (PS) presentan variaciones paralelas; así como esta consideración es válida en lo referente al ritmo circadiano, no puede hacerse extensiva al ritmo circatrigintano.

Al hacer referencia al ciclo circatrigintano (de aproximadamente 30 días) (Kawasaki *et al.*, 1978), con unos valores de $p < 0,001$ para PAS y PAM, $p = 0,010$ para PAD y $p = 0,024$ en FC, vemos que la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca se encuentran en alofase circatrigintana, es decir, se observa una gran diferencia en fase (de aproximadamente 150°) entre las dos variables cuando consideramos un periodo arbitrario de 30 días (720 horas), para realizar el análisis (tabla 8).

Por tanto, en el transcurso de un mes (aproximadamente 30 días), en el momento en que la PS alcanza sus valores predecibles más altos, los de la FC son mínimos. Esto se puede observar, tanto si ajustamos una curva coseno a los 92 MESORes circadianos ($n=92$) (figura 28), y en la Tabla 8; en la que al observar el componente circatrigintano se aprecia que las acrofases de la PS están relacionadas entre sí, pero en alofase respecto de la FC. Esto no ha podido ser consultado con otros autores, pues no se han encontrado citas al respecto. A diferencia de esto, en dicha tabla, podemos comprobar que la PAS, la PAM y la PAD, siguen el mismo patrón circadiano que la FC, alcanzando los valores máximos al mismo tiempo; quedando reflejado, tanto en la gráfica 28 como en la gráfica 29.

La gráfica 29 nos proporciona una representación polar de los resultados; circadiana a la derecha y circatrigintana a la izquierda. En la circadiana, las elipses de confianza (A, B, C y D) referentes a la PS y la FC, se localizan en la misma zona de la circunferencia polar, es decir sus acrofases ocurren en aproximadamente las mismas horas, las elipses se superponen entre sí y no encierran el centro de la circunferencia, lo que significa que el ritmo es estadísticamente significativo. En la representación del componente circatrigintano (izquierda), en la cual $360^\circ \equiv 720$ horas, las elipses de confianza de la PS (PAS, PAM, PAD; A, B y C respectivamente) se superponen presentando una relación entre fases, estando la FC casi en antifase respecto de la PS (D).

Los MESORes de la presión sanguínea y de la frecuencia cardíaca, circadiano y circatrigintano, son aproximadamente los mismos (tabla 8). Como el componente circadiano es más prominente que el circatrigintano, existirá una mayor variación predecible en la PS y FC circadianas, con amplitudes de aproximadamente 10 mm de Hg, por tanto, las variaciones diarias totales serán de ± 20 mm de Hg, mientras que a lo largo del mes sólo se aprecian variaciones circatrigintanas máximas de ± 5 mm de Hg. Estos datos pueden servir para dar una explicación de la gran variabilidad de la PS y FC, como hemos comprobado (tabla 9).

También se demostró un componente de aproximadamente 84 horas (circasemiseptano) en la FC ($p=0,010$), pero no en la PS ($p>0,05$) (tabla 9), lo que apoya la teoría de la existencia de cierta disociación entre la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca, lo que podría ayudarnos a poner solución a los problemas cardíacos, en un futuro no muy lejano.

CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos sacar de ellos las siguientes conclusiones:

1ª CONCLUSION: Existe un ritmo circadiano endógeno, con dos componentes (circadiano y circasemidiano), del cortisol plasmático en conejos NZW, cuya acrofase está sincronizada por el ciclo de luz-oscuridad.

2ª CONCLUSION: Se define el cronoma de los marcadores de crecimiento salivares, CA125 y CA130. Este fluido biológico puede ser una alternativa a las extracciones que se realizan para el control de crecimiento de los tumores.

3ª CONCLUSION: Se demuestra la existencia de los marcadores de crecimiento en personas sanas, hecho hasta ahora desconocido. El ritmo circadiano es similar al de las personas con cáncer, con una acrofase entre las 04:00 y 05:00 de la mañana, y con una amplitud y MESOR mayores.

4ª CONCLUSION: Se demuestra la existencia de una alofase infradiana, pero no circadiana, entre la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea.

CONCLUSION FINAL El empleo de la **cronofisiología** se recomienda en cualquier estudio experimental, con el objeto de reducir la gran variabilidad de márgenes, hasta ahora existentes en los parámetros fisiológicos. Por lo que se aconseja un **diseño experimental cronofisiológico** para llevar a cabo correctamente un protocolo de investigación.

GLOSARIO

Acrofase (ϕ):

Distancia que hay desde un tiempo de referencia dado (como puede ser la medianoche o el despertar), hasta el momento en que se producen los valores máximos de un ritmo (pico), definida mediante una función matemática ajustada a los datos. La acrofase se expresa en grados (negativos), donde 360° equivalen al periodo elegido (circadiano, circaseptano, etc.) y se toma 0° como tiempo de referencia. En el caso de los ritmos circadianos, cuando se elige 0° como la medianoche, la acrofase también se puede expresar en horas y minutos.

Computativa (ϕ): acrofase referida a una fecha y hora de reloj arbitrarias fisiológicamente, por ejemplo, la medianoche local.

Externa (): el tiempo de referencia es un punto en un ciclo ambiental sincronizante, por ejemplo, la mitad del intervalo de oscuridad.

Interna (Φ): acrofase referida a la acrofase de otro ritmo con el mismo periodo en la misma unidad fisiológica.

Alofase:

Se dice que dos variables están en alofase en un periodo dado, cuando sus acrofases son estadísticamente diferentes una de la otra, de forma significativa.

Amplitud (A):

La mitad del cambio rítmico predecible que se produce en un ciclo estimado mediante una función (sinusoidal u otra). En una curva coseno es la diferencia que hay desde el pico de la curva hasta el MESOR. El cambio total predecible es la doble amplitud ($2A$).

Antifase:

Gran diferencia, de aproximadamente la mitad de un ciclo ($180^\circ \pm 15^\circ$), en la localización temporal (acrofase u ortofase) de dos ritmos con el mismo periodo.

Armónico:

Cualquier función periódica, con un periodo dado (τ) se puede considerar como la suma de un término constante (MESOR) y de funciones cosinusoidales con periodos τ , $\tau/2$, $\tau/3$, etc., con amplitudes y acrofases dadas. El componente con un periodo τ es el armónico fundamental o armónico de primer orden; el componente con τ/n es el armónico enésimo, donde $n=2, 3$, etc.

Bioaliasing:

Ambigüedad o errónea interpretación de uno o más componentes del periodo (τ), en las series temporales asociadas a intervalos un poco largos entre muestras consecutivas y separadas en el tiempo por intervalos iguales ($t \geq \tau/2$); por ejemplo, simulación de un ritmo o tendencia, que resulta del inapropiado muestreo de un ritmo oculto de alta frecuencia y más generalmente, todos los productos resultantes de una densidad de muestreo, insuficiente para detectar las características (cambiantes o estacionarias) de los ritmos (acrofase, amplitud, forma de la onda o frecuencia).

Bioperiodicidad:

Ciclos ocultos, aunque se presupone su existencia.

Bisincronización:

Sincronización debida a dos factores, por ejemplo, dos factores ambientales, como pueden ser la alternancia de luz y oscuridad, y la disponibilidad o no de comida. Por esto mismo tri- o multisincronización puede significar sincronización por tres o más factores (incluyendo, p.e., los fármacos).

Características de un ritmo:

Parámetros cuantificables objetivamente, como son el periodo (τ), la acrofase (ϕ), la amplitud (A) y el MESOR (M), determinados mediante deducciones estadísticas al ajustar una función matemática mediante aproximaciones.

Ciclo:

Conjunto de estados consecutivos y/o cambios específicos o acontecimientos que se repiten regularmente de una forma fisiológicamente completa, con una frecuencia reconocible o con un periodo que se repite en el tiempo.

Circadiano:

Término que deriva del latín *circa* (=aproximadamente) y *dies* (=día ó 24 horas), relacionado con ritmos o variaciones biológicas, con una frecuencia de aproximadamente un ciclo en 24 horas, $\tau = 24 \pm 4$ horas.

Cron:

Elemento particular dentro del cronoma, como son las características de un ritmo.

Cronobiología:

Ciencia que cuantifica e investiga objetivamente los mecanismos de la estructura temporal biológica (cronoma), incluyendo las manifestaciones rítmicas de la vida. Neologismo que proviene de los términos: *chronos* (=tiempo), *bio* (=vida) y *logie* (= ciencia). Diseñada para describir las características de los ritmos; en términos fisiológicos, proporciona conceptos de aplicación general y técnicas para resolver (observar y cuantificar), problemas referentes al estudio de los ciclos predecibles en los organismos y, para aislar los efectos ambientales, de los mecanismos endógenos propios que están enmascarados.

Cronodesmo:

Intervalo de referencia especificado en el tiempo y respecto del momento del ritmo.

Cronofarmacología:

Debe entenderse como la aproximación cronobiológica a los fenómenos farmacológicos (una metodología cronobiológica envuelve un menor riesgo de error y/o falsa información, que el método homeostático convencional).

Cronofisiología:

Estudia las manifestaciones temporales de los procesos fisiológicos, evalúa las interacciones cíclicas biológicas (endocrinas, nerviosas, metabólicas, etc.) con el organismo, el cual sirve de base a las características biológicas temporales y a la interacción de éstas con el medio ambiente.

Cronograma:

Representación gráfica de los datos de forma individual o en conjunto en función del tiempo, haciendo que la ritmicidad sea fácilmente reconocida.

Cronoma:

Neologismo que proviene de *chronos* (=tiempo), *nomos* (=regla) y *cromosoma*. Se define como la estructura temporal de las variables o sistemas biológicos, que se resuelven como aproximaciones, mediante parámetros deducidos estadísticamente (crones) y resuelto con la ayuda de ordenadores, en las series temporales de datos. El cronoma está codificado genéticamente y está sincronizado ambientalmente por los ciclos del hábitat socioecológico; está influido por la dinámica de los campos magnéticos interplanetarios y puede alterarse por procesos endógenos (como son, la elevación del riesgo de enfermedad o cualquier patología), o también por factores externos, como son, cambios en los hábitos sociales o en los horarios habituales, administración de fármacos y por el medio ambiente. La cronobiología se encarga del estudio de las propiedades predecibles algorítmicamente y del significado biológico del cronoma.

Cronopatología:

Estudia las alteraciones de las características biológicas temporales como causantes, resultantes o concomitantes de los estados de enfermedad (endocrinopatías, cáncer, alteración de la presión sanguínea, por citar algunas).

Cronoterapia:

Tratamiento terapéutico efectuado, teniendo en cuenta los factores temporales y en particular los ritmos.

Cronotolerancia:

Momentos predecibles, con una significación estadística más alta de la normal, en los que se presenta resistencia a los tratamientos psico-químicos u otros, sin mostrar un efecto desfavorable, debido a los diferentes tiempos de su administración.

Cronotoxicología:

Se encarga de la descripción de los efectos no deseados o nocivos de los agentes químicos, físicos o de otra naturaleza (incluyendo una sobredosificación) en las características biológicas temporales y en función del tiempo biológico.

Curso libre:

Cuando una bioperiodicidad continúa con su frecuencia natural, aunque esté bajo unas condiciones ambientales fijadas (por ejemplo, condiciones constantes o cíclicas de 24 horas), por lo general, ligeramente distinto de cualquier factor ambiental conocido.

Deriva de la acrofase:

Desplazamiento gradual y continuo de la acrofase de un ritmo, a lo largo de la escala del tiempo, con un periodo que difiere ligeramente al del ciclo de referencia.

Descenso o valle (momento de):

El punto o los puntos más bajos del modelo completo recurrente de una variable.

Desincronización:

Se dice que dos variables están desincronizadas, si difieren estadísticamente de forma significativa en su frecuencia o en su acrofase (desincronización en frecuencia o acrofase), habiendo estado sincronizadas previamente.

Externa: cuando un ritmo biológico se desincroniza respecto a un ciclo ambiental.

Interna: cuando dos o más ritmos biológicos de la misma unidad fisiológica, se desincronizan el uno respecto del otro.

Dominio del espectro:

Subdivisión del amplio espectro de ritmos fisiológicos (ultradianos, circadianos o infradianos) o exhibición de las características de los ritmos a lo largo de la escala de frecuencias, en vez de a lo largo de la escala del tiempo.

Elipse de confianza:

Ver Región de confianza.

Fase:

Ver Acrofase.

Forma de la curva (W):

Patrón completo de una variación periódica.

Frecuencia (f):

Es el número de veces que ocurre un tipo de acontecimiento dado, o el *número de miembros de una población que se encuentran dentro de una determinada clase*. En el estudio de las bioperiodicidades, es el número de ciclos que ocurren por unidad de tiempo, es decir, el recíproco del periodo (τ).

$$f = \frac{1}{\tau}$$

Harbinger:

Acontecimiento o cambio de alguna de las características del ritmo, previo al desarrollo de una alteración o enfermedad.

Infradiano:

Relativo a variaciones biológicas o ritmos con un periodo superior al circadiano, $\tau > 28$ horas, vamos a enumerar algunos de ellos:

Circasemiseptano o de aproximadamente media semana,

$$\tau = 3,5 \pm 1 \text{ día}$$

Circaseptano o de aproximadamente una semana,

$$\tau = 7 \pm 1,5 \text{ días}$$

Circavigintano o de aproximadamente veinte días,

$$\tau = 21 \pm 3 \text{ días}$$

Circatrigintano o de aproximadamente un mes,

$$\tau = 30 \pm 5 \text{ días}$$

Circanual o de aproximadamente un año,

$$\tau = 1 \pm 2 \text{ meses}$$

Circasepteniano o de aproximadamente siete años,

$$\tau = 7 \pm 1 \text{ año}$$

Intervalo de confianza (IC):

Intervalo deducido estadísticamente para un solo parámetro investigado.

La afirmación de que un parámetro dado está dentro de este intervalo, será cierta en la mayoría de los casos, con una proporción de $1 - \alpha$ (1 menos α) de los casos analizados, cuando se fija la probabilidad α (p.e., 0,05), en base a la cual se hace esta afirmación.

Intervalo de referencia:

Margen de valores que se espera que contengan un número específico o una proporción de las observaciones futuras, también se llama margen normal, intervalo de predicción o intervalo de tolerancia. Ver cronodesmo.

Isofase:

Se dice que dos variables se encuentran en isofase en un periodo dado, cuando sus acrofases u ortofases son similares ($\pm 15^\circ$) y no son significativamente diferentes.

Límites de confianza:

Los valores más bajo y más alto que constituyen los límites del intervalo de confianza.

Límites de tolerancia:

A diferencia de los límites de confianza, los límites de tolerancia son valores que limitan dentro de los cuales caerá, con una probabilidad fija ($1 - \alpha$), una proporción específica de una distribución. Dichos límites pueden ser usados para decidir, si unas determinadas observaciones provienen de la misma población analizada con anterioridad y usada para determinar los límites. En cronobiología se llama cronodesmo.

MESOR (M):

Acrónimo de "Midline Estimating Statistic of Rhythm". Valor medio de una función rítmica (curva coseno) ajustada a los datos de una serie temporal, normalmente es el punto medio entre los picos y descenso de la curva coseno. Es una media ajustada al ritmo.

Movimiento de la acrofase:

Desplazamiento relativamente sencillo, abrupto o gradual, aunque transitorio, de la acrofase de un ritmo en relación a un ciclo dado, a lo largo de la escala del tiempo y que tiene lugar durante un determinado espacio de tiempo.

Ortofase:

Distancia desde un determinado punto de referencia en el tiempo, hasta el pico de la función no sinusal (múltiples componentes), aproximada a un ritmo estimado de forma apropiada, que resulta al ajustar un modelo que consiste en la combinación de dos o más armónicos.

Periodo (P):

La duración de un ciclo completo en una variación rítmica.

Pico (momento del):

Instante en el que se producen los máximos valores de un modelo completo, expresado a lo largo de la escala del tiempo. Momento en el que el ritmo alcanza su máximo.

Porcentaje del ritmo (PR):

Porcentaje de variabilidad explicada por un modelo ajustado.

$$PR = VR \times 100$$

Proporción de variabilidad (VR):

Es la parte útil de la señal (p.e., del ritmo), calculado como la fracción de la variabilidad total producida por la curva ajustada.

Referencia de la acrofase:

Punto en el tiempo, que se toma como referencia para la estimación de una acrofase.

Régimen de luz:

Alternancia entre luz y/u oscuridad (LO), a la cual se expone un organismo.

Región de confianza:

Generalización del intervalo de confianza, en el caso en que se consideren dos o más parámetros. Es la región en el espacio a la cual le corresponde la probabilidad $1 - \alpha$ (1 menos α), de que el parámetro esté dentro de ella.

Ritmo:

Cronobiológicamente definido, es la componente periódica predecible de las series temporales biológicas, demostrada mediante medias deducidas estadísticamente, preferiblemente mediante características objetivamente cuantificables (es decir, frecuencia, acrofase, amplitud, MESOR y/o forma de la onda).

Ritmo de referencia:

El ritmo de una variable usado como tiempo de referencia para otros ritmos, acontecimientos o acciones.

Ritmometría:

Descripción de un ritmo mediante pruebas de hipótesis definidas estadísticamente y la estimación de sus características, como: MESOR, amplitud, acrofase, ortofase y/o periodo. La aplicación de la cronobiología se basa, fundamentalmente, en la evaluación cuantitativa de los datos recogidos en función del tiempo, mediante estos métodos (ritmometría deducida estadísticamente) y con una adecuada base de datos.

Sección en serie cronobiológica:

Método gráfico y analítico. Se obtiene ajustando una curva coseno a los datos en cada sección de datos, solapados o no, y desplazándola en incrementos a través de las series de tiempo. Este procedimiento proporciona la estimación de los parámetros del ritmo (M , A , ϕ), los valores de la p (para el rechazo o aceptación del ritmo, asumiendo la hipótesis nula; $A = 0$) y el número de datos por intervalo, los cuales aparecen representados en paralelo con los datos originales.

Series temporales:

Secuencias cronobiológicas de valores parejos, uno de los cuales es el tiempo y el otro una característica cuantitativa de un individuo o de una población, en el tiempo considerado.

Sincronización:

Estado de un sistema, cuando dos o más variables muestran periodicidades con la misma frecuencia y acrofases específicas, y/o con frecuencias que son múltiplos enteros o submúltiplos de otra.

Sincronizador:

También llamado *zeitgeber*, es la periodicidad ambiental que determina la posición temporal de un ritmo biológico dado, a lo largo de una apropiada escala temporal, obligando al ritmo a sincronizarse, es decir, a asumir su frecuencia, o un múltiplo entero o submúltiplo de su frecuencia y una acrofase específica.

Ultradiano:

Ritmo con un periodo menor de 20 horas, $\tau < 20$ h. Algunos ejemplos de estos ritmos son:

Circaoctohorano o de aproximadamente ocho horas,

$$\tau = 8 \pm 1,5 \text{ horas}$$

Circasemidiano o aproximadamente medio día,

$$\tau = 12 \pm 2 \text{ horas}$$

Ventana cronobiológica:

Estimación de cualquiera de las características de un ritmo, en función de los periodos de interés en regiones o dominios espectrales, mediante la aplicación de los procedimientos del cosenior simple, no sólo en un sólo periodo fijado, sino en un conjunto de supuestos periodos y disminuciones entre periodos consecutivos, ajustados mediante la

rítmometría de los mínimos cuadrados. Se puede aplicar cuando se desconoce el periodo de un ritmo biológico, pero se asume que está dentro de un cierto margen.

Zeitgeber:

Neologismo que proviene de los términos alemanes *Zeit* (= dador) y *geber* (= tiempo), dador de tiempo. Ver Sincronizador.

Términos obtenidos del Glossary of Chronobiology, cuyos autores son: F. Halberg, F. Carandente, G. Cornélissen y G.S. Katinass. *Chronobiologia* 4 (Suppl.1): 1-189, 1977.

BIBLIOGRAFIA

- APFELBAUM, M., A. REINBERG, P. NILLUS y F. HALBERG.- Rythmes circadiens de l'alternance veille-sommeil pendant l'isolement souterrain de sept jeunes femmes.
Presse méd. **77**: 879-882, 1969.
- ASCHOFF, J., M. FATRANSKA, H. GIEDKE, P. DOERR, D. STAMM y H. WISSER.- Human circadian rhythms in continuous darkness: Entrainment by social cues.
Science **171**: 213-215, 1971.
- ASCHOFF, J. y H. POHL.- Phase relations between a circadian rhythm and its Zeitgeber within the range of entrainment.
Naturwissenschaften **65**: 80-84, 1978.
- ASCHOFF, J.- Circadian rhythms: general features and endocrinological aspects. En: Endocrine Rhythms, editado por D. Krieger, Raven Press, New York, 1979, p. 1-61.
- BARTTER, F.C., C.S. DELEA, W. BAKER, F. HALBERG y J.K. LEE.- Chronobiology in the diagnosis and treatment of Mesor-hypertension.
Chronobiologia **3**: 199-213, 1976.
- BAST, R.C. JR., M. FEENEY, H. LAZARUS, L.M. NADLER, R.B. COLVIN y R.C. KNAPP.- Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma.
J. Clin. Invest. **68**: 1331-1337, 1981.
- BINGHAM, CH., B. ARBOGAST, G. CORNELISSEN GUILLAUME, J.K. LEE y F. HALBERG.- Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters.
Chronobiologia **9**: 397-439, 1982.

- BINGHAM, C., G. CORNELISSEN, E. HALBERG, y F. HALBERG.- Testing period for single cosinor: extent of human 24-h cardiovascular synchronization on ordinary routine.
Chronobiologia 11: 263-274, 1984.
- BINGHAM, C., G. CORNELISSEN y F. HALBERG.- Power of chronobiologic designs. Toward phase zero preclinical and clinical trials: Chronobiologic designs and illustrative applications. Seminar # 6, editado por G. Cornélissen, E. Halberg, E. Bakken, P. Delmore, F. Halberg. University of Minesota. Medtronic Chronobilology Seminar Series, 1992, p. 242-245.
- BLANK, M.A., G. YAKOLEV, G. CORNELISSEN, A. PORTELA, R. ZASLAVSKAYA, y F. HALBERG.- Oncologically important difference in l timing of mitoses in human malignancy and bone marrow. En prensa.
- BRUSH, C.E. y R. FAYERWEATHER.- Observations on the changes in blood pressure during normal sleep.
Am. J. Physiol. 5: 199-210, 1901.
- BRUSS, R.T, E. JACOBSON, F. HALBERG, H.A. ZANDER y J.J. BITTNER.- Effects of lighting regimen and blinding upon gross motor activity of mice.
Fred. Proc. 17: 21, 1958.
- BUNNING, E.- The Physiological Clock. En: Circadian Rhythms and Biological Chronometry. The English Universities Press, Ltd., London; Springer Verlag, New York, 1973.
- CAVALLINI, M., F. HALBERG, D.E.R. SUTHERLAND, G. CORNELISSEN, J. HEIL y J.S. NAJARIAN: Optimization by timing of oral cyclosporine to prevent acute kidney allograft rejection in dogs.
Transplantation. 41: 654-657, 1987.

- CHAUDHRY A.P. y F. HALBERG.- Rhythms in blood eosinophils and mitoses of hamster pinna and pouch, phase alterations by carcinogen.
J. Dent. Res. **39**: 704, 1960.
- CHEN D.X., P.E. SCHWARTZ y F.Q. LI.- Saliva and serum CA125 assays for detecting malignant ovarian tumors.
Obstet. Gynecol. **75**: 701-704, 1990.
- COLOMBO, C.- Recherches sur la pression du sang chez l'homme.
Arch. Ital. Biol. **31**: 345-361, 1899 (citado por Halberg, 1989)
- CORNELISSEN, G., F. HALBERG, J. STEBBINGS, E. HALBERG, F. CARANDENTE y B. HSI.- Chronobiometry with pocket calculators and computer systems.
La Ricerca, Clin. Lab. **10**: 333-385, 1980.
- CORNELISSEN, G., E. HALBERG, F. HALBERG.- Circadian cardiovascular rhythms in ordinary life.
J. Minn. Acad. Sci. **49**: 18, 1984.
- CORNELISSEN, G.- Time structure of blood pressure variability in healthy and 'hypertensive' individuals: implications concerning sampling requirements.
Chronobiologia **14**: 165, 1987.
- CORNELISSEN, G., E. BAKKEN, P. DELMORE, K. ORTH-GOMER, T. AKERSTEDT, O. CARANDENTE, F. CARANDENTE y F. HALBERG.- From various kinds of heart rate variability to chronocardiology.
Amer. Card. **66**: 863-868, 1990.

- CORNELISSEN, G., F. HALBERG, P. PRIKYL, E. DANKOVA, J. SIEGELONA y J. DUSEK.- tional Womb-to-Tomb Chronome Study Group: Prophylactic aspirin treatment: The merits of timing.
JAMA **266**: 3128-3129, 1991.
- CORNELISSEN, G., C. BINGHAM, D. WILSON y F. HALBERG.- Illustrating power of cost-effective 'Phase 0' chronobiologic trials in endocrinology, cardiology, psychiatry and oncology. En: Toward phase zero preclinical and clinical trials: Chronobiologic designs and illustrative applications: seminar # 6, editado por G. Cornélissen, E. Halberg, E. Bakken, P. Delmore, F. Halberg. University of Minnesota. Medtronic Chronobiology Seminar Series, 1992, p. 138-181.
- CROWLEY, T.J., D.F. KRIPKE, F. HALBERG, G.V. PEGRAM y J.J. SCHILDKRAUT.- Circadian rhythms of *Macaca mulatta*: sleep, EEG, body and eye movement and temperature.
Primates **13**: 149-167, 1972.
- DALLE, M., A. EL HAMI y P. DELOST.- Changes in cortisol binding and metabolism during neonatal development in the guinea pig.
J. Endocrinol. **85**: 219-225, 1980.
- DAWES, C.- Circadian and circannual maps for human saliva. En: Chronobiology, editado por L.E Scheving, F. Halberg y J.E. Pauly. Igaku Shoin Ltd. Tokyo, 1974, p. 224-227.
- DAWES, C.- Rhythms in salivary flow rate and composition.
Int. J. Chronobiol. **2**: 253-279, 1974 b.
- DELGADO, J.M.- Ritmos biológicos. En: Fisiología humana, editado por, J.A.F. Tresguerres. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, 1992, p. 1166-1180.

- DEPAOLO, L.V. y E.J. MASORO.- Endocrine Hormones in Laboratory Animals. En: The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, editado por, W.F. Loeb y F.W. Quimby. Pergamon Press. New York, 1989, p. 279-308.
- EINHORN, N., K. STOVAL y G. SCHOENFELD.- Early detection of ovarian cancer using CA-125 RIA.
Asco **9**: 607, 1990.
- EISERMAN, J. y J.L. COLLINS.- Enzyme immuno assay determination of CA125 in serum, peritoneal fluid, and follicular fluid from women with minimal endometriosis after ovarian hyperstimulation.
Fert. Ster. **51**: 344-347, 1989.
- ENGELI, M. y F. HALBERG.- Spectral analysis of steroid rhythms in data at equal or unequal intervals.
Fed. Proc. **23**: 897, 1964.
- FLINK, E.B. y F. HALBERG.- Clinical studies on eosinophil rhythm.
J. Clin. Endocrinol. **12**: 922, 1952.
- FRANK, G., R. HARNER, J. MATTHEWS, E. JOHNSON y F. HALBERG.- Circadian periodicity and the human electroencephalogram.
Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. **13**: 822, 1961.
- FUJIEDA, K., A.K. GOFF, M. PUGET y C.A. STROTT.- Regulation of the pituitary-adrenal axis and corticosteroid-binding globulin-cortisol interaction in the guinea pig.
Endocrinology **111**: 1944-1950, 1982.
- GANJAM, V.K., A.L. CAMPBELL y B.E.P. MURPHY.- Changing patterns of circulating corticosteroids in rabbits following prolonged treatment with ACTH.
Endocrinology **91**: 607-611, 1972.

- GARRIS, D.R.- The ovarian-adrenal axis in the guinea pig: effects of photoperiod, cyclic state and ovarian steroids on serum cortisol levels.
Horm. Metabol. Res. **18**: 34-37, 1986.
- GIESE, A.C.- Cell Physiology, editado por W.B. Saunders, Philadelphia, 1979, p. 1-609.
- GLICK, D., R.B. FERGUSON, L.J. GREENBERG y F. HALBERG.- Circadian studies on succinic dehydrogenase pantothenate and biotin of rodent adrenal.
Am. J. Physiol. **200**: 811-814, 1961.
- HAEN, E., F. HALBERG y G. CORNELISSEN.- Cortisol marker rhythmometry in pediatrics and clinical pharmacology. En: Annual Review of Chronopharmacology, Proc. 1st Int. Montreux Conf. on Biological Rhythms and Medications, Montreux, Switzerland, 1984, editado por A. Reinberg, M. Smolensky, G. Labrecque, Pergamon Press, Oxford, 1984, p. 165-168.
- HAGA, Y., K. SAKAMOTO, H. EGAMI, R. YOSHIMURA y M. AKAGI.- Evaluation of serum CA125 values in healthy individuals and pregnant women.
Am. J. Med. Sci. **292**: 25-29, 1986.
- HALBERG, F.- A precision measuring adapter for small-volume syringes.
Experientia **6**: 69, 1950.
- HALBERG, F. y M.B. VISSCHER.- Regular diurnal physiological variation in eosinophil levels in five stocks of mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) **75**: 846-847, 1950.
- HALBERG, F., J.J. BITTNER y M.B. VISSCHER.- Tail blood eosinophil levels in several inbred strains of mice under standard conditions.
Blood **6**: 832-837, 1951.

HALBERG, F., J.J. BITTNER y M.B. VISSCHER.- Diurnal rhythm in tail blood eosinophil levels.

Cancer Res. **11**: 253-254, 1951.

HALBERG, F., E.B. FLINK y M.B. VISSCHER.- Alteration in diurnal rhythm in circulating eosinophil level in adrenal insufficiency.

Amer. J. Physiol. **167**: 791, 1951.

HALBERG, F., M.B. VISSCHER, E.B. FLINK, K. BERGE y F. BOCK.- Diurnal rhythmic changes in blood eosinophil levels in health and in certain diseases.

J. Lancet (USA) **71**: 312-319, 1951.

HALBERG, F. y M.B. VISSCHER.- Effect of light and of availability of food upon the 24-hour rhythm in number of circulating eosinophils in mice.

Amer. J. Physiol. **171**: 732, 1952.

HALBERG, F.- Some physiological and clinical aspects of 24 hour periodicity.

J. Lancet **73**: 20-32, 1953.

HALBERG, F., M.B. VISSCHER, y J.J. BITTNER.- Eosinophil rhythm in mice: range of occurrence; effects of illumination, feeding and adrenalectomy.

Am. J. Physiol. **174**: 109-122, 1953.

HALBERG, F. y G.G. NABIAS.- Eosinopénie sanguine matinale dans différents territoires vasculaires du chien non anesthésié. Proceedings Vth tional Congress of Hematology. Sorbonne. Paris, 1954, p. 282.

HALBERG, F., M.B. VISSCHER y J.J. BITTNER.- Relation of visual factors to eosinophil rhythm in mice.

Amer. J. Physiol. **179**: 229-235, 1954.

HALBERG, F. y M.B. VISSCHER.- Temperature rhythms in blind mice.

Fed. Proc. 13: 65, 1954.

HALBERG, F., J.J. BITTNER, R.J. GULLY, P.G. ALBRECHT y E.L. BRACKNEY.- 24-hour periodicity and audiogenic convulsions in I mice of various ages.

Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 88: 169-173, 1955.

HALBERG, F. y G.G. NABIAS: Observations sur l'eosinopénie matinale chez le chien.

Rev. Belge Pathol. 24: 287-295, 1955.

HALBERG, F., C.P. BARNUM, R.H. SILBER y J.J. BITTNER.- 24-hour rhythms at several levels of integration in mice on different lighting regimens.

Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 97: 897-900, 1958.

HALBERG, F.- Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle.

Z. Vitamin., Hormon - u. Fermentforsch 10: 225-296, 1959.

HALBERG, F., E. HALBERG, C.P. BARNUM y J.J. BITTNER.- Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. En: Photoperiodism and related Phenomena in Plants and Animals, publ. nº 55 of the Amer. Assoc. Adv. Sci, editado por R. B. Withow. Washington. D.C., 1959, p. 803-878.

HALBERG, F.- The 24-hour scale: a time dimension of adaptative functional organization.

Perspect. Biol. Med. 3: 491-527, 1960.

- HALBERG, F.- Symposium on 'Some current research methods and results with special reference to the central nervous system'. Physiopathologic approach.
Amer. J. ment. Defic. **65**: 156-171, 1960.
- HALBERG, F.- Temporal coordination of physiologic function.
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **25**: 289-310, 1960b.
- HALBERG, F. y A.P. CHAUDRY.- Blood eosinophil rhythm in the hamster.
Amer. J. Physiol **199**: 807-808, 1960.
- HALBERG, F., E.A. JOHNSON, B.W. BROWN y J.J. BITTNER.- Susceptibility rhythm to *E. coli* endotoxin and bioassay.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) **103**: 142-144, 1960.
- HALBERG, F. y R.L. CONNEN.- Circadian organization and a periodogram on behavior of *Escherichia coli* growing in fluid culture.
Proc. Minn. Acad. Sci. **29**: 227-239, 1961.
- HALBERG, F. y H. PANOFSKY : I. Thermo-variance spectra; method and clinical illustrations.
Exp. Med. Surg. **19**: 284-309, 1961.
- HALBERG, F.- Physiologic 24-hour rhythms: A determinant of response to environmental agents. En: Man's Dependence on the Earthly Atmosphere, editado por K. E. Schaefer. Mac Millan Company. New York, 1962, p. 48-98.
- HALBERG, F.- Circadian (about 24-hour) rhythms in experimental medicine.
Proc. roy. Soc. Med. **56**: 253-257, 1963.
- HALBERG, F., F. UNGAR y E. HAUS.- Adrenal corticosterone production and responsiveness to ACTH, *in vitro* in mice with ectopic pituitary isografts.
Proc. Amer. Ass. Cancer res. **4**: 25, 1963.

- HALBERG, F.- Organisms as circadian systems; temporal analysis of their physiologic and pathologic responses, including injury and death. En: Medical Aspects of Stress in the Military Climate. Walter-Reed Army Institute of Research Symposium, 1964, p. 1-36.
- HALBERG, F., M. DIFFLEY, M. STEIN, H. PANOFSKY y G. ADKINS.- Computer techniques in the study of biological rhythms.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **115**: 695-720, 1964.
- HALBERG, F. y C. HAMBURGER.- Electronic computer techniques for the study of endocrine rhythms. Psychoendocrinology.
Acta endocr.(Suppl.) **100**: 170, 1965.
- HALBERG, F., Y.L. TONG y E.A. JOHNSON.- Circadian system phase-an aspect of temporal morphology; procedures and illustrative examples. En: The Cellular Aspects of Biorhythms. Symposium on Biorhythms. Proc. tional Congress of Anatomists. Springer - Verlag, 1967, p 20-48.
- HALBERG, F.- Chronobiology.
Ann. Rev. Physiol. **31**: 675-725, 1969.
- HALBERG, F.- Body temperature, circadian rhythms and the eye. En: Photorégulation de la Reproduction chez les Oiseaux et les Mammifères, editado por J. Benoit, I. Assenmacher. Paris. Centre National de la Recherche Scientifique No 172, 1970, p. 497-528.
- HALBERG, F.- Chronobiology and delivery of health care. En A System Approach to the Application of Chronobiology in Family Practice, editado por J. O' Leary, Health Care Research Program, Department of Family Practice and Community Heath, University of Minnesota, 1970, p. 31-96.

HALBERG, F., W. NELSON, W.J. RUNGE, O.H. SCHMITT, G.C. PITTS, J. TREMOR y O.E. REYNOLDS.- Plans for orbital study of rat biorhythms. Results of interest beyond the Biosatellite program.
Space Life Sci. 2 : 437-471, 1971.

HALBERG, F., E.A. JOHNSON, W. NELSON, W. RUNGE y R. SOTHERM.- Autorhythmometry procedures for physiologic self-measurements and their analysis.
Physiol. Tchr. 1: 1-11, 1972.

HALBERG, F. y B.M. VISSCHER.- Effect of light and of availability of food upon the 24-hour rhythm in number of circulating eosinophils in mice.
Am. J. Physiol. 171: p. 732, 1972.

HALBERG, F., E. HAUS, S.S. CARDOSO, L.E. SCHEVING, J.F.W. KÜHL, R. SHIOTSUKA, G. ROSENE, J.E. PAULY, W. RUNGE, J.F. SPALDING, J.K. LEE y R.A. GOOD.- Toward a chronotherapy of neoplasia: Tolerance of treatment depends upon host rhythms.
Experientia 29: 909-934, 1973.

HALBERG, F.- Protection by timing treatment according to bodily rhythms. An analogy to protection by scrubbing before surgery.
Chronobiologia 1 (Suppl. 1): 27-68, 1974.

HALBERG, F., H. BUCHWALD, K. CHARYULU y E. REEKER.- Autorhythmometry and cancer of the breast-a case report. En: *Chronobiology*, Proc. Int. Soc. for the Study of Biological Rhythms, Little Rock, Ark, editado por L.E. Scheving, f. Halberg and j.e Pauly. Georg Thieme Publishers, Sttugart; Igaku Shoin Ltd. Tokyo, 1974, p. 293-298.

HALBERG, F.- When to treat.
Indian Journal Cancer 12: 1-20, 1975.

HALBERG, F.- Biological rhythms. En: Biological Rhythms and Endocrine Function, editado por L.W. Hedlund, J.M. Franz y A.D. Kenny. Plenum Press. New York, 1975, p. 1-32.

HALBERG, F., F. CARANDENTE, G. CORNELISSEN, y G.S. KATINASS.- Glossary of Chronobiology.
Chronobiologia 4 (Supl.1): 1-189, 1977.

HALBERG, F. y J.K. LEE, NELSON.- Time-qualified reference intervals-chronodesms.
Experientia 34: 713-716, 1978.

HALBERG, F.- Les rythmes biologiques et leurs mécanismes: base du developpement de la chronopsychologie et de la chronoéthologie. En: Du Temps Biologique au Temps Psychologique, editado por P. Fraisse, F. Halberg, H. Lejeune, J.A. Michon, J. Montangero, J. Nuttin y M. Richelle. Presses Universitaires de France. Paris, 1979, p. 21-72.

HALBERG, F.- Chronobiology: methodological problems.
Acta Med. Rom. 18: 393-397, 1980.

HALBERG, E. y F. HALBERG.- Chronobiologic study design in everyday life, clinic and laboratory.
Chronobiologia 7: 95-120, 1980.

HALBERG, J., E. HALBERG, D.K. HAYES, R.D. SMITH, F. HALBERG, C.S. DELEA, R.S. DANIELSON y F.C. BARTTER.- Schedule shifts, life quality and quantity-modeled by murine blood pressure elevation and arthropod lifespan.
Int. J. Chronobiol. 7: 17-64, 1980.

HALBERG, F., G. CORNELISSEN, R.B. SOTHERN, L.A. WALLACH, E. HALBERG, A. AHLGREN, M. KUZEL, A. RADKE, J. BARBOSA, F. GOETZ, J. BUCKLEY, J. MANDEL, L. SHUMAN, E. HAUS, D. LAKATUA, L. SACKETT, H. BERG, H.W. WENDT, T. KAWASAKI, M. UENO, K. UEZONO, M. MATSUOKA, T. OMAE, B. TARQUINI, M. CAGNONI, M. GARCIA SAINZ, E. PEREZ VEGA, D. WILSON, K. GRIFFITHS, L. DONATI, P. TATTI, M. VASTA, I. LOCATELLI, A. CAMAGNA, R. LAURO, G. TRISCH, y L. WETTERBERG.- tional geographic studies of oncological interest on chronobiological variables. En: Neoplasms-Comparative Pathology of Growth in Animals, Plants and Man, editado por H. Kaiser, Williams and Wilkins. Baltimore, 1981, p. 553-596

HALBERG, F., R. GÜNTHER, M. HEROLD y E. HALBERG.- Circadian and circaseptan (about-7-day) desynchronization of urinary cortisol by ACTH in arthritics. *Proc. endocrinol. Soc.* 1981, p. 331.

HALBERG, J., E. HALBERG, P. REGAL y F. HALBERG.- Changes with age characterize circadian rhythms in telemetered core temperature of stroke-prone rats.
J. Gerontol. **36**: 28-30, 1981.

HALBERG, F.- Quo vadis basic and clinical chronobiology: promise for health maintenance.
Am. J. Anat. **168**: 543-534, 1983.

HALBERG, F.- Preface. En: Chronobiology 1982-1983, editado por E. Haus, H. Kabat, S. Karger. Basel, 1984, p. 5-8.

HALBERG, F., G. CORNELISSEN, D. WILSON y C. FERENCZ.- Circadian systolic amplitude separates boys of parents with or without a high blood pressure.
Chronobiologia **13**: 371-372, 1986.

HALBERG, F., G. CORNELISSEN, R. HALBERG, P. DELMORE, M. SHINODA y E. BAKKEN.- Chronobiology of human blood pressure. Medtronic Continuing Medical Education Seminars, 4 th. ed., 1989, p. 1-242.

HALBERG, F.- Some aspects of the chronobiology of nutrition: more work is needed on when to eat.
J. Nutr. **119**: 333-343, 1989.

HALBERG, F., G. CORNELISSEN, R. KOPHER, L. CHOROMANSKI, D. EGGEN, K. OTSUKA, E. BAKKEN, B. TARQUINI, D.C. HILLMAN, P. DELMORE, Y. KAWABATA, M. SHINODA, R. VERNIER, B. WORK, M. CAGNONI, P. CUGINI, S. FERRAZZANI, U. SITKA, D. WEINERT, J. SCHUH, J. KATO, K. KATO y K. TAMURA.- Chronobiologic blood pressure and ECG assessment by computer in obstetrics, neonatology, cardiology and family practice - En: Computers and Perinatal Medicine, Proc. 2nd World Symp. Computers in the Care of the Mother, Fetus and Newborn, editado por K. Maeda, M. Hogaki, H. Nakaro. Kyoto, Japan, 1989, p. 23-26.

HALBERG, F., G. CORNELISSEN y E. BAKKEN.- Caregiving merged with chronobiological outcome assesment, research and education in health maintenance organizations (HMOs). En: Clinical Medicine, General Biology, and Agriculture, Chronnobiology: Its role in Part B, editado por D.K. Hayes, J.E. Pauly, R.J Reiter. Wiley-Liss. New York, 1990, p 491-549.

HALBERG, F.- Circadian cortisol in women, 1992, (comunicación personal).

HALBERG, F., G. CORNELISSEN, C. BINGHAM, S. FUJII y E. HALBERG.- From experimental units to unique experiments. Chronobiologic pilots complement large trials.
In vivo **6**: 403-428, 1992.

HALBERG, F., E. HALBERG, G. CORNELISSEN, S. FUJII, G. NICOLAU, E. HAUS, S. RAMAKRISHNAN, F. XU, Y. YU, R. WALKER y H. J. LONG.- Triangulation of growth marker chronomes of cancer for treatment timing. En: Toward phase zero preclinical and clinical trials: Chronobiologic designs and illustrative applications: Seminar # 6, editado por G. Cornelissen, E. Halberg, E. Bakken, P. Delmore, F. Halberg. University of Minnesota. Medtronic Chronobiology Seminar Series, 1992, p. 191-198.

HALES, S.- Statical Essays: Containing Hamastaticks. London: W. Innys and R. Manby, 1733. 1-361 pp. (citado por Halberg, 1989).

HAMBLEN-COYLE, M., W.A. ZEHRING, C.P. KYRIACOU, P. REDDY, Q. YU, D.A. WHEELER, L.J. ZWIEBEL, R.J. KONOPKA, M. ROSBASH y J.C. HALL.- Germ-line transformation involving DNA from the period locus in *Drosophila melanogaster*: Overlapping genomic fragments that restore circadian and ultradian rhythmicity to *per*⁰ and *per*- mutants. *J. Neurogenet.* 3: 249-291, 1986.

HAMBLEN-COYLE, M.J., D.A. WHEELER, J.E. RUTILA, M. ROSBASH y J.C. HALL. - Behavior of period-altered circadian rhythm mutants of *Drosophila* in light: dark cycles (Diptera: Drosophilidæ). *J. Ins. Behav.* 5: 417-446, 1992.

HANSON, B.R., F. HALBERG, N. TUNA, T.J.Jr. BOUCHARD, D.T. LYNKEN, G. CORNELISSEN y L.L. HESTON.- Rhythmometry reveals heritability of circadian characteristics of heart rate of human twins reared apart. *Cardiol.* 29: 267-282, 1984.

HARDIN, P.E., J.C. HALL y M. ROSBASH.- Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA. *Nature* 343: 536-540, 1990.

HAUS, E. y F. HALBERG.- 24-hour rhythm in susceptibility of C mice to a toxic dose of etanol.

J. Appl. Physiol. **14**: 878-880, 1959.

HAUS, E., D. LAKATUA y F. HALBERG.- The internal timing of several circadian rhythms in the blinded mouse.

Exp. Med. Surg. **25**: 7-45, 1967.

HAUS, E. y F. HALBERG.- Circannual rhythm in level and timing of serum corticosterone in standardized inbred mature C-mice.

Environ. Res. **3**: 81-106, 1970.

HAUS, E., G. CORNELISSEN, F. HALBERG.- Introduction to Chronobiology. En: Proceedings of the NATO Advanced Study Institute on Chronobiology: Principles and Applications to Shifts in Schedules, editado por F. Halberg, E. Haus, Hannover, Germany, 1979 p. 1-32.

HAWKING, S. W.- En: A brief history of time from the big bang to black holes, editado por Bantam, p. 171-175, 1988.

HILL, L.- On rest, sleep and work and the concomitant changes in circulation of the blood.

Lancet **1**: 282-285, 1898 (citado por Halberg, 1989).

HILLMAN, D., J.R. FERNANDEZ, G. CORNELISSEN, D.A. BERRY, J. HALBERG y F. HALBERG.- Bounded limits and statistical inference in chronobiometry. En: Chronobiology. Its Role in Clinical Medicine, General Biology, and Agriculture, Part B, editado por D.K. Hayes, J.E. Pauly, R.J. Reiter. Wiley-Liss, New York, 1990, p. 417-428.

HOWELL, W.H.- A contribution to the physiology of sleep, based upon pieithysmographic experiments.

J. Exp. Med. **2**: 313-346, 1987.

ILLERA, J.C., G. SILVAN, J. MARTIN, R. MANJON, A. PORTELA, P. LORENZO y M. ILLERA.- Variaciones fotoperiódicas de algunas constantes de la bioquímica sanguínea del conejo.

Rev. Esp. Fisiol. **48**: 7-12, 1992.

INABA, N., Y. OKAJIMA, Y. OTA, I. FUKAZAWA, T. YAMAGUCHI, N. SATO, H. SUDO, M. MILANGA, H. TAKAMIZAWA, S. FUJII y T. MORI.- A fundamental and clinical investigation of cancer antigen 130 (CA130) in the field of obstetrics and gynecology.

J. Jpn. Soc. Cancer Ther. **24**: 2426-2435, 1989.

ITAHASHI, K., N. INABA, I. FUKAZAWA, H. TAKAMIZAWA.- Immunoradiometrical measurement of tissue polypeptide antigen (TPA) and cancer antigen 125 (CA125) in pregnancy and at delivery.

Arch. Gynaec. Obstet. **243**: 187-191, 1988.

JACOBS I, T.N. FAY, I. STABILE, J. BRIDGES, D.H.O. ORAM y J.G. GRUDZINSKAS.- The distribution of CA125 in the reproductive tract of pregnant and non-pregnant women.

Br. J. Obstet. Gynaecol. **95**: 1190, 1988.

JANEWAY, T.C.- The clinical study of blood presure, editado por D. Apleton & Co., New York, 1904, p. 1-300.

JÄGER W., C. MEIER, L. WILDT, W. SAUERBREI y N. LANG.- CA-125 serum concentrations during the menstrual cycle.

Fertil. Steril. **50**: 223-227, 1988.

- JÄGER W., W. DÖTTERL, L. WILDT.- Increasing CA-125 levels during delivery.
J. Tumor Marker Oncol **5**: 95-100, 1990a.
- KAINE, H.D., H.S. SELTZER y J.W. CONN.- Mechanism of diurnal eosinophil rhythm in man.
J. Lab. Clin. Med. **45**: 247-252, 1955.
- KATZ, F.H. y I.L. SHANNON.- Identification and significance of parotid fluid corticosteroids.
Acta Endocrinol. **46**: 393, 1964.
- KATZ, F.H. y I.L. SHANNON.- Parotid fluid, cortisol and cortisone.
J. Clin. Invest. **48**: 848, 1969a.
- KATZ, F.H. y I.L. SHANNON.- Adrenal corticosteroids in submaxillary fluids.
J. Dent. Res. **48**: 448, 1969b.
- KAWASAKI, T., M. MATSOUKA, E. HALBERG y F. HALBERG.- Circadian and circatrigintan rhythms in pulse, oral temperature and blood pressure of a clinically healthy Japanese woman.
Chronobiologia **5**: 399-406, 1978.
- KOBAYASHI, F., N. SAGAWA, Y. NANBU, K. NAKAMURA, M. NONOGAKI, C. BAN, S. FUJII y T. MORI.- Immunohistochemical localization and tissue levels of tumor-associated glycoproteins CA125 and CA 19-9 in the decidua and fetal membranes at various gestational ages.
Am. J. Obstet. Gynecol. **160**: 1232-1238, 1989.

- KOBAYASHI, F., S. FUJII, M. NONOGAKI, Y. NANBU, T.IWAI, I. KONISHI, N. SAGAWA, T. MORI, M.N. HOSONO Y K. KENDO.- An extraordinary high CA125 level in a woman without apparent pathological foci of CA125 production: dissociation between serum levels of CA125 and CA130. *Am. J. Ob. Gyn.* **165**: 1297-1299, 1991.
- KUMAGAI, Y., G. CORNELISSEN y F. HALBERG.- Adjustement of blood pressure chronome after a trans-9-meridian flight. En: Toward phase zero preclinical and clinical trials: Chronobiologic desings and illustrative applications: seminar # 6, editado por G. Cornélissen, E. Halberg, E. Bakken, P. Delmore, F. Halberg. University of Minnesota. Medtronic Chronobiology Seminar Series, 1992, p. 254-257.
- KUMAGAI, Y., T. SHIGA, K. SUNAGA, G. CORNELISSEN, A. EBIHARA y F. HALBERG.- Usefulness of circadian amplitude of blood pressure: Predicting hypertensive cardiac involvement. *Chronobiologia* **19**: 43-58, 1992.
- LAMBA V.J., K. SHANKARAIHAH, B.I. SUNDARARAJ, S.V. GOSWAMY y F. HALBERG.- Infradian modulation of circadian rhythm in plasma cortisol of catfish, *heteropneustes fossilis*. *Int. J. Chronobiol.* **7**: 273, 1981.
- LEFCOURT, A., J. BITMAN y F. HALBERG.- *E. coli* endotoxin and *Streptococcus agalactiae*-induced changes in deep body temperature of a cow. *Chronobiologia* **10**: 138-139, 1983.
- LEFCOURT, A.- Circadian and ultradian rhythms in ruminants: relevance to farming and science. En: Chronobiology: Its Role in Clinical Medicine, General Biology, and Agriculture, Part B, editado por D.K. Hayes, J.E. Pauly, R.J. Reiter. Wiley-Liss. New York, 1990, p. 735-763.

- LEUNG, B., G. CORNELISSEN, D. HILLMAN, Z.R. WANG, S. BINKLEY, C. BINGHAM y F. HALBERG.- Halting steps toward a circadian-infradian pineal melatonin chronome. En: Proc. Workshop on Computer Methods on Chronobiology and Chronomedicine, editado por K. Otsuka, H. Watanabe, G. Cornélissen, F. Halberg. Tokyo Press, 1990.
- LEVINE, H. y F. HALBERG.- Circadian rhythms of the circulatory system, Literature Review. Computerized case study of transmeridian flight and medication effects on a mildly hypertensive subjects. U.S. Air Force Report SAM-TR-72-3, 1972, p. 64.
- LOPEZ-CALDERON.- Glándulas suprarrenales. En: Fisiología humana, editado por, J.A.F. Tresguerres. Interamericana McGraw-Hill. Madrid, 1992, p. 971-991.
- MARQUART, D. W.- An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters.
J. Soc. Indust. Appl. Math. **11**: 431-441, 1963.
- MCVIE, R., L.S. LEVINE y M.I. NEW.- The biologic significance of the aldosterone concentration in saliva.
Pediat. Res. **13**: 755-759, 1979.
- NELSON, W., L. SCHEVING y F. HALBERG.- Circadian rhythms in mice allowed single daily meal at different stages of LD (12:12) lighting regimen.
J. Nutr. **105**: 151-184, 1975.
- NONOGAKI, H., S. FUJII, I. KONISHI, Y. NANBU, F. KOBAYASHI y T. MORI.- Serial changes of serum CA125 levels during menstrual cycles.
Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol. **17**: 369-378, 1991.
- NICHOLS, C.T. y F.H. TYLER.- Diurnal variations in adrenal cortical function.
Ann. Rev. Med. **18**: 313-324, 1967.

NICHOLS, D.J. y P.D.F. CHEVINS.- Plasma corticosterone fluctuations during the estrous cycle of the house mouse.

Experientia **37**: 319-320, 1981.

PANOFSKY, H., F. HALBERG.- II. Thermo-variance spectra; simplified computational example and other methodology.

Exp. Med. Surg. **19**: 323-338, 1961.

QUIRK, J.G., G.L. BRUNSON, C.A LONG, G.A. BANNON, M.M. SANDERS y T.J. O'BRIEN.- CA125 in tissue and amniotic fluid during pregnancy.

Am J. Obstet. Gynecol. **159**: 644-649, 1988.

RENSING, L.- Oscilations and Morphogenesis. En: Cellular Clocks Series/5, Marcel Dekker Inc., New York, 1992, p. 520.

REDGATE, E.S., R.R. FOX y F.H. TAYLOR.- Strain and age effects on immobilization stress in JAX rabbits.

Proc. Soc. exp. Med. **166**: 442-448, 1981.

RUMMEL, J.A., J.K. LEE, y F. HALBERG.- Combined linear-nonlinear chronobiologic windows by least-squares resolve neighboring components in a physiologic rhythm spectrum- En: Biorhythms and Human Reproduction, Int. Inst. For the Study of Human Reproduction Conference Proceedings, editado por M. Ferin, F. Halberg, R.M. Richart y R. Van de Wiele. John Wiley & Sons Inc. New York. USA, 1974, p 53-82.

RUNGE, W., K. LANGE y F. HALBERG.- Some instruments for chronobiologists developed and used in systems at the University of Minnesota.

Int. J. Chronobiol. **2**: 327-341, 1974.

- SANCHEZ DE LA PEÑA, S., F. HALBERG, F. UNGAR, E. HAUS, D. LAKATUA, L.E. SCHEVING, E. SANCHEZ y P. VECSEL.- Circadian pineal modulation of pituitary effect on murine corticosterone *in vitro*.
Brain Res. Bull. **10**: 559-565, 1983.
- SCHMITT, G., F. HALBERG y G. CORNELISSEN.- La chronobiologie et l'enseignement secondaire.
Biol. Géol. Bull. Pédagog. trimest. **65**: 414-441, 1978.
- SCHNEIDER, R.A. y J.P. COSTILOE.- Seasonal variation in cardiovascular functioning.
Arch. Envir. Health **24**: 10-16, 1972.
- SIFFRE, M., A. REINBERG, F. HALBERG, J. GHATA, G. PERDRIEL y R. SLIND.- L'isolement souterrain prolongé. Étude de deux sujets adultes sains avant, pendant et après cet isolement.
Presse méd. **4**: 915-919, 1966.
- SILVAN, G.- Correlaciones entre tamaño folicular y niveles de hormonas esteroides en ganado vacuno. Tesis Doctoral. UCM, 1991.
- SINGH, R.K., J.P.N. CHANSOURIA y K.N. UDUPA.- Circadian periodicity of plasma cortisol (17-OHCS) levels in normal, traumatized, corticotropin-and dexamethasone-treated rabbits.
Ind. J. Med. Res. **63**: 793-798, 1975.
- SOKAL R.R. y F.J. ROHLF: Biometry. Freeman & Co., 1981.
- SOTHERN, R.B., E. HALBERG, D. CULLEY y F. HALBERG.- Circadian rhythms in rectal temperature of female inbred Fischer rats on various lighting regimens. *Proc. Minn. Acad. Sci.* 1978, p. 24.

SOTHERN, R.B. y F. HALBERG.- Circadian and infradian blood pressure rhythms of a man 20 to 37 years of age. Proc. 2nd Int. Conf Medico-Social Aspects of Chronobiology, Florence, 1984, editado por F. Halberg, L. Reale y B. Tarquini, Instituti Italiano di Medicina Sociale, Rome, 1986, p. 395-416.

SOTHERN, R.B y F. HALBERG.- Timing of circadian core temperature rhythm in rats on 5 lighting schedules with different photofractions.
Chronobiologia 6: 158-159, 1979.

SOWERS, J.R., B. SHARP, R.E. LEVIN, M.S. GOLUB y P. EGGENA.- Metoclopramide, a dopamine agonist, stimulates aldosterone secretion in rhesus monkeys but not in dogs or rabbits.
Life Sci. 29: 2171-2175, 1981.

SUNDARARAJ, B.I., S. VASAL y F. HALBERG.- Circannual rhythmic ovarian recrudescence in the catfish, *Heteropneustes fossilis*.
Int. J. Chronobiol. 1: 362-363, 1973.

SUNDARARAJ, B.I., P. NATH y F. HALBERG.- Circadian meal timing in relation to lighting schedule optimizes catfish body weight gain.
J. Nutr. 12: 1085-1097, 1982.

TOUITOU, Y., A. BOGDAN y Y. DARBOIS.- CA125 ovarian cancer associated antigen in cancer and pregnancy: interpretation of enzyme immunoassay and immunoradiometric assay.
Anticancer Res. 9: 1805-1808, 1989.

UEZONO, K., E. HAUS, J. SWOYER y T. KAWASAKI.- Circaseptan rhythms in clinically healthy subjects. En: Chronobiology 1982-1983, editado por E. Haus, H. Kabat y S. Karger. Basel, 1984, p. 257-262.

- UNGAR F. y F. HALBERG.- In vitro explotation of a circadian rhythm in adrenocorticotropic activity of C mouse hypophysis.
Experientia **19**: 158-159, 1963.
- WALKER R.F., G.F. READ, D.W. WILSON, D. RIAD-FAHMY, K. GRIFFITHS.- Chronobiology in laboratory medicine: principles and clinical applications illustrated from measurements of neutral steroids in saliva. En: Chronobiology: Its Role in Clinical Medicine, General Biology and Agriculture. Part A, editado por D.K. Hayes, J.E. Pauly, R.J. Reiter. Wiley-Liss. New York, 1990, p. 105-117.
- WEITZMAN E.D., D. FUKUSHIMA, C. NOGEIRE, H. ROFFWARG, T.F. GALLAGHER, L. HELLMAN.- Twenty-four-hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects.
J. Clin. Endocr. Metab. **33**: 14-18, 1971.
- WILSON D.W., F.R. WALKER, G.F. READ, K. GRIFFITHS.- Potential value of salivary steroids in chronoepidemiological and endocrine-related studies. En: Chronobiology: Its Role in Clinical Medicine, General Biology and Agriculture, Part A, editado por D.K. Hayes, J.E. Pauly, R.J. Reiter. Wiley-Liss. New York, 1990, p. 119-130.
- WOLLNIK F.- Physiology and regulation of biological rhythms in laboratory animals: an overview.
Lab. Anim. **23**: 107-125, 1989.
- WRBSKY, P., M. MILLS, G. CORNELISSEN, D. JOHNSON y F. HALBERG.- Circadian and circaseptan chronome components of systolic blood pressure and heart rate in preterm babies. En: Toward phase zero preclinical and clinical trials: Chronobiologic desings and illustrative applications: seminar # 6, editado por G. Cornélissen, E. Halberg, E. Bakken, P. Delmore y F. Halberg. University of Minnesota. Medtronic Chronobiology, 1992, p. 138-181.

XU F., C.R. BAST JR., Y. YU, E. HALBERG, G. CORNELISSEN, E. HAUS y F. HALBERG.- Urinary excretion of OVXI and M-CSR by an ovarian cancer patient: circadian and ultradian structure. En: Toward phase zero preclinical and clinical trials; Chronobiologic desings and illustrative applications: seminar # 6, editado por G. Cornélissen, E. Halberg, E. Bakken, P. Delmore y F. Halberg. University of Minnesota Medtronic Chronobiology seminar series, 1992, p. 221-228.

YOUNG M.W.- Molecular Genetics of Biological Rhythms. Cellular Cloks Series/4, editado por Marcel Dekker Inc., New York, 1992, p. 336.

ZADEK M.- Die Messung des Blutdrucks am Menschen mittels des Bauschen Apparates.
Z. Klin. Med. 2: 509-551, 1881 (citado por Halberg, 1989).